ENTWICKLUNG EINER VOLLBLUT-TECHNIK ZUR MESSUNG DER ZELLULÄREN IMMUNITÄT GEGEN HERPESVIREN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Phamazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

MONIQUE ODETTE LEROUX
aus Biberach/Riß

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0018

ENTWICKLUNG EINER VOLLBLUT-TECHNIK ZUR MESSUNG DER ZELLULÄREN IMMUNITÄT GEGEN HERPESVIREN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Phamazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

MONIQUE ODETTE LEROUX
aus Biberach/Riß

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.1986

Dekan: Prof.Dr.D.Mecke

1. Berichterstatter: Prof.Dr.E.Reinhard

2. Berichterstatter: Prof.Dr.H.Kirchner

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virusforschung des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg, Abteilung Tumorvirus-Immunologie, durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. E. Reinhard, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen, möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Hauptreferates bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Kirchner für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie sein Interesse, seine wertvollen Anregungen und die mir jederzeit gewährte Unterstützung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Braun für die Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H.W. Doerr für die Antikörpernachweise, bei Herrn Dr. med. vet. W. Nicklas für die Mykoplasmennachweise und bei Herrn Dr. rer. nat. H. Zentgraf für die elektronenmikroskopischen Präparationen ganz herzlich bedanken. Auch sie standen mir jederzeit hilfreich zur Seite.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Virusforschung, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützten, danke ich für die Hilfsbereitschaft.

Zuletzt gilt mein Dank Frau Marion Kasamasch für die schreibtechnische Anfertigung dieser Dissertation.

Aufstellung der im Text verwendeten Abkürzungen

BME	Basal medium Eagle
Ci, /uCi	Curie, Mikrocurie (Maßeinheit der Radioaktivität) 1 Ci = 10^6 /uCi
CMV	Zytomegalie Virus
Con A	Concanavalin A (Pflanzenlektin aus Canavalia ensiformis)
cpm	Counts per minute (Zerfall pro Minute)
EBV	Epstein Barr Virus
FCS; FKS	Foetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec^2), hier: Maß der Zentrifugalbeschleunigung
HEL	Humane embryonale Lungenfibroblasten
HEp-2	Epidermoides Larynxkarzinom
HLA	Human lymphocyte antigen system A
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV	Human T-Cell Leukemia Virus
I.E.	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LPS	Lipopolysaccharid (Zellwandfraktionen gramnegativer Bakterien)
MOI	Multiplicity of infection (bei Infektionen mit Virus in vitro: Anzahl infektiöser Virionen pro Zelle)
NDV	Newcastle Disease Virus
NIH	National Institutes of Health
NK	Natural Killer Zellen
PFU	Plaque forming units (Plaque-bildende Einheit = 1 infektiöses Viruspartikel)
PHA	Phytohämagglutinin (Pflanzenlektin aus Phaseolus vulgaris)
PWM	Pokeweed Mitogen (Pflanzenlektin aus Phytolacca americana)
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
VZV	Varizella Zoster Virus
WISH	Amnionzellen

Inhalt Seite

I.	EINLEITUNG	1
1.	Die Herpesvirusgruppe	1
1.1.	Allgemeine Aspekte	1
1.2.	Herpes Simplex Virus (HSV)	2
1.3.	Varizella Zoster Virus (VZV)	3
1.4.	Epstein Barr Virus (EBV)	4
1.5.	Zytomegalie Virus (CMV)	5
1.5.1.	Allgemeine Aspekte des CMV	5
1.5.2.	Epidemiologie und klinische Aspekte des CMV	6
2.	Die Immunantwort des menschlichen Organismus	9
2.1.	Zelluläre und humorale Immunität	9
2.1.1.	Unspezifische Abwehrmechanismen	15
2.1.2.	Interferone	16
II.	ZIELSETZUNG	19
III.	MATERIAL	21
1.	Gewebekulturbedarf	21
2.	Geräte	22
3.	Reagenzien	23
4.	Materialien für die Zellkultur	29
5.	Gewebezellkulturen	32
6.	Stimulantien	33
6.1.	Virusstämme	33
6.2.	Bakterielle Antigene	33
6.3.	Antikörper	33
6.4.	Mitogene	34
7.	Patienten und Kontrollpersonen	34
7.1.	Gesunde Individuen	34
7.1.1.	Normalkollektiv	34
7.1.2.	Nabelschnurblut	34
7.1.3.	Säuglinge	35

Seite

7.2. Patientenkollektive 35
7.2.1. Patienten mit Herzoperationen 35
7.2.2. Männliche Homosexuelle mit Lymphadenopathie-Syndrom 35
7.2.3. Kolonkarzinom-Patienten 36
7.2.4. Schizophrenie-Patienten 36
7.2.5. Sarkoidose-Patienten 37

IV. METHODEN 38

1. Gewinnung von Humanblut 38
2. Gewinnung von Humanserum 38
3. Präparation menschlicher Lymphozyten 38
4. Bestimmung der Lymphozytenzahl 40
5. Vitalitätsprüfung mit Trypanblau 41
6. Vollbluttechnik 41
7. Lymphoproliferationstest 43
8. Interferon-Testüberstände 43
9. Interferon-Test (IFN) 44
9.1. Durchführung 44
9.2. Bestimmung des IFN-Titers 47
10. Gewebezellkulturen 50
11. Virus 52
11.1. Verwendete Virusstämme 52
11.1.1. Humanes Zytomegalie-Virus (HCMV), Stamm AD169 und Stamm Davis 52
11.1.2. Herpes Simplex Virus Typ 1, Stamm WALCH (HSV-1 WAL) 52
11.2. Mykoplasmennachweis 53
11.2.1. Mykoplasmennachweis durch Kultivierungsmethode 54
11.2.2. Mykoplasmennachweis durch DNS-Analyse in der Dichtegradienten-Zentrifugation 54
11.3. Herstellung mykoplasmenfreier HCMV-Virusstämme mittels Transfektion und Virusklonierung 55
11.3.1. Isolierung viraler DNS aus infizierten HEL-Zellen 55
11.3.2. Reinigung der viralen DNS 55
11.3.3. Transfektion 56
11.3.4. Virusklonierung 56

		Seite
11.4.	Virusreinigung von HCMV	56
11.5.	Charakterisierung von HCMV	57
11.5.1.	Elektronenmikroskopische Darstellung der Virionen	57
11.5.2.	Virusstammcharakterisierung durch DNS-Analyse	57
11.5.2.1.	Dichtebestimmung mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation	57
11.5.2.2.	Identifizierung des Virusstammes	58
11.6.	Bestimmung des infektiösen Virustiters durch Plaque-Test	59
11.7.	Methoden zur Virusinaktivierung	62
12.	Bestimmung von Serum-Antikörpern gegen HCMV und HSV-1 mit Hilfe der ELISA-Technik	62
13.	Statistik	64
V.	ERGEBNISSE	65
1.	Vorarbeiten	65
1.1.	Gewinnung mykoplasmenfreier HCMV-Stämme durch Transfektion	65
1.2.	Viruscharakterisierung	68
2.	Lymphoproliferation und Interferoninduktion in humanen Lymphozyten	70
2.1.	Einfluß der Lymphozyten-Zelldichte auf die Lymphoproliferation	70
2.2.	Einfluß der Konzentration von FCS auf die Lymphoproliferation und Interferonproduktion	71
2.3.	Einfluß von autologem und gepooltem humanem AB-Serum auf die Lymphoproliferation und Interferoninduktion	71
3.	Lymphoproliferation und Interferoninduktion in humanem Vollblut	73
3.1.	Einfluß des Mischungsverhältnisses von Vollblut und Medium	73
3.2.	Einfluß von fetalem Kalbsserum (FCS)	74
3.3.	Einfluß von autologem und allogenem Serum	74
3.4.	Austestung verschiedener Kulturmedien	76
3.5.	Einfluß der Lagerungszeit und der Temperatur auf die Lymphoproliferation und Interferoninduktion	78
3.6.	Kinetik der Lymphoproliferation	78
3.7.	Kinetik der Interferonproduktion	83
3.8.	Einfluß verschiedener Mikrotiterplatten auf die Lymphoproliferation	85
3.9.	Einfluß des CO_2-Gehalts in Inkubatoren auf Lymphoproliferation und Interferonproduktion	88

Seite

3.10. Einfluß verschiedener Antikoagulantien auf Lymphoproliferation und Interferonproduktion 89

3.11. Lymphozytenstimulation und Interferonproduktion im Vergleich zwischen Vollblut und isolierten Lymphozyten 90

3.12. Untersuchungen bei falsch-positiven Interferontitern in menschlichem Serum und Plasma 93

4. Untersuchungen zu verschiedenen Inaktivierungsmethoden der viralen Antigene 95

5. Untersuchungen von Kontrollpersonen 96

5.1. Untersuchung eines Normalkollektivs 96

5.2. Untersuchung eines Nabelschnurblutkollektivs 105

5.3. Untersuchung von Säuglingen 105

6. Untersuchungen von Patientenkollektiven 108

6.1. Untersuchung von Patienten mit Herzoperationen 108

6.2. Untersuchung von männlichen Homosexuellen mit Lymphadenopathie-Syndrom 115

6.3. Untersuchung der Lymphoproliferation in Vollblutkulturen von Kolonkarzinom-Patienten prä- und postoperativ 124

6.4. Untersuchung der Lymphoproliferation und Interferonproduktion im Vollblut von Schizophreniepatienten 130

6.5. Untersuchung der Lymphoproliferation in Vollblutkulturen von Sarkoidose-Patienten 138

VI. DISKUSSION 145

VII. ZUSAMMENFASSUNG 175

VIII. LITERATURVERZEICHNIS 178

I. EINLEITUNG

1. Die Herpesvirusgruppe

1.1. Allgemeine Aspekte

Herpesviren sind Viren, die beim Mensch und bei vielen verschiedenen Tierarten vorkommen. Das genetische Material in den Herpesviren liegt als lineare doppelsträngige DNA vor und besitzt ein Molekulargewicht von 68-150 x 10^6 Dalton. Diese DNA kann aufgrund ihrer Größe für 60-90 Proteine kodieren, zu denen auch eine Reihe von virusspezifischen Enzymen gehört (Übersicht bei Kirchner, 1982). Diese DNA repliziert im Kern der infizierten Zelle und wird zu ikosahedralen Kapsiden, bestehend aus 162 prismatischen Kapsomeren, verpackt. Die Kapside des infektiösen Partikels sind von einer ethersensitiven Hülle und Glykoproteinen umgeben (Honess und Watson, 1977). Eine genetische Verwandtschaft zwischen den Vertretern der Herpesgruppe ist wenig ausgeprägt (Roizman, 1969), wie die äußerst geringe Sequenzhomologie der DNA zeigt. Eine Charakterisierung kann daher nach serologischen Methoden und nach Restriktionsanalysen der DNA getroffen werden. Ein weiteres Kriterium zur Charakterisierung besteht in der Ausbildung eines zytopathischen Effekts in verschiedenen Zellkulturtypen. Mikroskopische Untersuchungen sind dagegen nicht geeignet, da alle Herpesviren dieselbe Morphologie aufweisen.

Man unterscheidet zwischen fünf menschlichen Herpesviren:

- Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1)
- Herpes Simplex Virus Typ 2 (HSV-2)
- Varizella Zoster Virus (VZV)
- Epstein Barr Virus (EBV)
- Zytomegalie Virus (CMV)

Da die herpetischen Krankheitsbilder oft in Hautläsionen resultieren, weist dies auf eine starke Affinität der meisten Herpesviren für Zellen ektodermalen Ursprungs hin. Sie bewirken wie Pockenviren, eine weitere Gruppe von DNA Viren, eine fokale Zytopathogenität, die Vesikel oder Pocken hervorruft. Herpesviren zeigen aber auch eine starke Neurovirulenz. Sie können das Nervengewebe befallen; meist werden periphere sensorische Nervenzellen infiziert, aber auch intrazerebrale Infektionen sind bekannt. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist, daß es durch diese Viren zu latenten und rekurrenten Infektionen kommt (Übersicht bei Ginsberg, 1980). Dies läßt sie auch im Zusammenhang mit der Genese bestimmter Tumoren interessant erscheinen (Matas et al., 1975; Rapp und Reed, 1976).

1.2. Herpes Simplex Virus (HSV)

Das Herpes Simplex Virus kommt in zwei antigenetisch unterschiedlichen Typen vor: HSV Typ 1 und HSV Typ 2 (Übersicht bei Nahmias und Roizman, 1973). Zwischen ihnen besteht eine Sequenzhomologie von etwa 50%, sodaß sie als Untertypen eines gemeinsamen Virus angesehen werden können. Andererseits unterscheiden sie sich in ihrer DNA soweit, daß sie sich aufgrund molekularbiologischer Kriterien klar unterscheiden lassen.

HSV kommt unter natürlichen Verhältnissen nur beim Menschen vor, und zwar offensichtlich weltweit. In Europa sind bei 80-90% der Bevölkerung Antikörper gegen HSV im Serum nachweisbar, obwohl es nur in wenigen Prozent der Fälle zu klinisch relevanten Krankheitsbildern kommt. Diese machen sich durch das Auftreten von Herpeseffloreszenzen an Haut und Schleimhäuten des Nasenraumes, Mundes, der Lippen und am Genitale bemerkbar. Der Herpes genitalis ist eine der wichtigsten, sexuell übertragbaren Erkrankungen. Hier sei erwähnt, daß die in früheren Jahren brauchbare Zuordnung der HSV-1 Stämme zum Herpes

labialis und der HSV-2 Stämme zum Herpes genitalis als weitgehend überholt angesehen werden muß, da bis zu 50% der genitalen Virusisolate dem Typ 1 zuzuordnen sind. Weitere HSV-induzierte Krankheitsbilder sind die Herpeskeratitis, die in 1% der Fälle zur Erblindung führt, sowie die Herpessepsis. Selten und differentialdiagnostisch schwer zu identifizieren ist die herpetische Meningoencephalitis, sowie die herpetische Hepatitis. Nicht zu vernachlässigen ist auch die Gefahr der HSV-Infektion des Neugeborenen. Auch hier kann es zu schwerwiegenden Schäden wie Meningoencephalitis, Splenomegalie, Pneumonie, Koma und somit zum Tod des Neugeborenen kommen.

HSV-Infektionen können an der Stelle der Primärinfektion wiederholt und zeitlebens auftreten, wobei Faktoren wie Fieber, UV-Bestrahlung und Streß als Auslösemechanismen für die Reaktivierung der in den sensorischen Ganglien latent verbliebenen Viren gelten (Übersichten bei Kirchner, 1982; Braun und Kirchner, 1986).

1.3. Varizella Zoster Virus (VZV)

Das Varizella Zoster Virus ist ein stark zellgebundenes menschliches Herpesvirus, die VZV DNA besitzt ein Molekulargewicht von 80-100 x 10^6 Dalton. Primärinfektionen mit VZV resultieren in einer akuten generalisierten Virusinfektion, der Varizella oder Windpocken, wobei das Virus anschließend lebenslang latent im Spinal- bzw. Kopfganglion verbleibt. Die Varizella ist eine weitverbreitete und häufige Kinderkrankheit von äußerst hoher Kontagiosität und meist leichtem Verlauf. Durch noch nicht geklärte Ursachen kann eine Reaktivierung des Virus erfolgen, die sich meist bei älteren Menschen als Gürtelrose oder Zoster äußert (Oakes et al., 1977).

Virusisolate von Primärinfektionen und Zoster lassen sich immunologisch nicht voneinander unterscheiden. Serologische Studien zeigten, daß die Varizellen und der Zoster durch dasselbe Virus verursacht werden.

Das VZV ist das noch am wenigsten erforschte Virus der Herpesgruppe. Dies beruht auf der Tatsache, daß es sehr stark zellgebunden ist und es eine äußerst schwierige und zeitaufwendige Aufgabe ist, zellfreies VZV zu isolieren (Übersichten bei Taylor-Robinson und Caunt, 1972; Hyman, 1980).

1.4. Epstein Barr Virus (EBV)

Das Epstein Barr Virus und das Zytomegalie Virus sind neben Herpes Simplex Virus und Varizella Zoster Virus Herpesviren, die eine Infektion beim Menschen hervorrufen. Das EBV kommt ubiquitär auf der ganzen Welt vor und ist der Erreger der Infektiösen Mononukleose oder Pfeifferschen Drüsenfiebers. Dies ist eine gutartige Erkrankung, die bei Erstinfektion mit EBV im Jugendalter auftreten kann. Daneben gibt es auch klinisch inapparent verlaufende Erstinfektionen. Der Durchseuchungsgrad der Bevölkerung mit EBV liegt bei ca. 80% (Levin et al., 1979). Das Epstein Barr Virus ist in den Verdacht geraten, bei der Entstehung zweier menschlicher Tumoren ursächlich beteiligt zu sein (Epstein et al., 1964).

Die Assoziation des EBV mit dem Burkitt Lymphom, wie auch mit dem Nasopharynxkarzinom, ergab sich aus der Tatsache, daß das EBV wie auch die genetische Information (DNA) des EBV regelmäßig im Tumorgewebe Erkrankter gefunden wurde (Henle et al., 1970). Hinzu kommt, daß das EBV eine ausgeprägte Affinität für B-Lymphozyten besitzt und es ohne Schwierigkeiten möglich ist, in vitro B-Lymphozyten durch EBV zu transformieren, d.h. sie zu immortalisieren. Da die Transformation eine Voraussetzung für die Entstehung von Tumorzellen ist und das Burkitt Lymphom ein reines B-Zell Lymphom darstellt, entstand der Verdacht, daß das EBV als Kofaktor bei der Genese dieses Tumors eine nicht unbedeutende Rolle spielt. Die Kofaktorhypothese gilt auch für das Nasopharynx-

karzinom der ostasiatischen Bevölkerung, obwohl hier noch die erhöhte Frequenz bestimmter HLA-Typen der Erkrankten eine Rolle spielt.

1.5. Zytomegalie Virus (CMV)

1.5.1. Allgemeine Aspekte des CMV

Das Zytomegalie Virus wurde erstmals vor knapp 30 Jahren isoliert, unabhängig voneinander in drei verschiedenen Laboratorien (Smith, 1956; Rowe et al., 1956; Weller et al., 1957). Neben den menschlichen Stämmen treten die Viren der Zytomegalie auch bei vielen Säugetierspezies auf, u.a. bei der Maus, beim Hamster und beim Pferd, von denen das Maus Zytomegalie Virus (MCMV) als Modellsystem zur Erforschung postnataler Zytomegalie-Infektionen Bedeutung erlangt hat. Morphologisch lassen sie sich nicht von den anderen Herpesviren unterscheiden.

Das humane Zytomegalie Virus (HCMV) ist nur für den Menschen pathogen und vermehrt sich nur in humanen Fibroblasten. Das Genom liegt wie bei allen Herpesviren als lineare doppelsträngige DNA vor; sie ist mit einem Molekulargewicht von 150×10^6 Dalton die größte aller Herpesviren. Umhüllt hat das CMV-Virion eine Größe von $180\text{-}250 \times 10^6$ Dalton. Zwischen den verschiedenen menschlichen Stämmen besteht eine DNA-Homologie von mindestens 80%, zwischen CMV DNA und der DNA der übrigen humanpathogenen Herpesviren (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV) dagegen von weniger als 5%.

Zu den bekannten internationalen Standardstämmen gibt es aus Patientenisolaten zahlreiche Wildtyp-Stämme. Im Gegensatz zu Herpes Simplex Virus, wo durch Restriktionsanalysen der DNA eine klare Unterscheidung zwischen HSV-1 und HSV-2 getroffen werden kann, gibt es bei HCMV keine definierten Subgruppen.

Die Untersuchung der Virus-Wirtszell-Interaktion in vitro ist dadurch erschwert, daß Infektionen mit HCMV durch einen für dieses Virus typischen lang andauernden Replikationszyklus und einen sich entsprechend langsam ausbildenden zytopathischen Effekt gekennzeichnet sind. Im produktiven Infektionszyklus entstehen in vivo und oft auch in vitro Riesenzellen mit nukleären und zytoplasmatischen Einschlußkörperchen (Übersicht bei Kirchner, 1983).

Die Fähigkeit zur Replikation ist mit wenigen Ausnahmen (Kim und Carp, 1971; Waner und Weller, 1974) wirtsspezifisch auf menschliche Zellen beschränkt. Darüberhinaus zeigen zwar morphologische Untersuchungen an Organen von erkrankten Patienten, daß HCMV in vivo zur Infektion epithelialer Zellen befähigt ist, in vitro repliziert das Virus aber vornehmlich in Fibroblasten (Krech et al., 1971; Rapp, 1984).

1.5.2. Epidemiologie und klinische Aspekte des CMV

Infektionen mit HCMV sind häufig (Literaturübersicht bei Kirchner, 1983). Das Virus ist weltweit verbreitet, wobei der Prozentsatz der seropositiven Individuen von sozioepidemischen Faktoren abhängt; er beträgt zwischen 30 und 100% (Krech, 1973; Melbye et al., 1983). Studien zeigen, daß je ärmer eine Bevölkerung, desto höher ist die Anzahl der Seropositiven. In Mitteleuropa sind bis zum 40. Lebensjahr mindestens 50% der Bevölkerung infiziert, wobei auch hier ein Stadt-Landgefälle berücksichtigt werden muß. Eine Studie aus Dänemark stellte einen Prozentsatz von 30% seropositiver Individuen fest (Melbye et al., 1983). HCMV führt bei Kindern und jungen Menschen in der Regel zu inapparent verlaufenden Infektionen, die nur an Auftreten von Antikörpertitern erkannt werden. Beim Erwachsenen äußert sich solch eine Infektion mit ähnlichen Symptomen wie die der Infektiösen EBV-Mononukleose. Dennoch gibt es generalisierte Infektionen durch HCMV.

Man nimmt an, daß in unserem Bevölkerungsraum ungefähr 1% aller Neugeborenen mit HCMV infiziert sind. Das Virus persistiert über viele Monate in den Lymphozyten und wird auf diesem Wege auf den Föten übertragen. Infizierte Schwangere können länger als ein Jahr Virus über das Zervikalsekret, Urin, Rachen und Muttermilch ausscheiden, ebenso ist die Virusausscheidung der Säuglinge über Urin und Rachen bis zu einem Jahr nachgewiesen (Stinski et al., 1981; Rapp, 1984). Dem Stadium der Persistenz folgt das Stadium der Latenz, in dem infektiöses Virus nicht mehr produziert wird, obwohl das Genom noch im Wirt enthalten ist (Stinski et al., 1981). Nach einer Infektion bleibt das Virus wahrscheinlich lebenslang im Organismus, kann aber unter Umständen wieder reaktiviert werden (Rapp, 1984). Eine intrauterine Infektion kann entweder zu der "Cytomegalic inclusion disease" führen, die sich in Hepatosplenomegalie, Gelbsucht, Hautblutung infolge Thrombozytopenie, Mikrozephalie und/oder geistige Entwicklungshemmung äußert und meist tödlich verläuft. Eine intrauterine Infektion kann bei Geburt aber auch klinisch inapparent verlaufen, aber auch sie resultiert oft in motorischen, sensorischen oder psychischen Entwicklungsstörungen. Auch Säuglinge, die unter bzw. kurz nach der Geburt infiziert werden, sind nicht selten von Spätschäden betroffen.

Generalisierte Infektionen durch HCMV kommen insbesondere bei Patienten vor, deren Immunsystem in seiner Funktion beeinträchtigt ist (Rapp, 1984). Dies ist der Fall bei massiven Bluttransfusionen, bei Immundefekten, z.B. bei Patienten mit Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), bei Transplantationen, bei Therapie mit Immunsuppression und bei malignen Tumoren (Macher et al., 1983).

Massive Bluttranfusionen können ein durch HCMV verursachtes mononukleoseartiges Syndrom zur Folge haben, wobei das Virus durch Leukozyten übertragen wird. Da das HCMV zwar aus den Leukozyten Erkrankter (Macher et al., 1983), aber nur sporadisch aus Leukozyten Gesunder isoliert worden ist, haben Kirchner

(1983) und Hirsch (1984) geschlossen, daß HCMV in Leukozyten in latenter Form vorliegt, aus der das Virus durch den Kontakt mit Fremdantigenen (Leukozyten des Blutempfängers) zur produktiven Infektion reaktiviert wird.

HCMV-Infektionen treten häufig bei Patienten mit AIDS auf; das Virus läßt sich regelmäßig aus den Leukozyten dieser Patienten isolieren (Macher et al., 1983). Obwohl vor allem HTLV III als Ursache des komplexen Syndroms verdächtigt wird, muß die mögliche Beteiligung von HCMV in Betracht gezogen werden. Es wird schon seit langer Zeit mit dem Auftreten des Kaposi-Sarkoms in Uganda und Tanzania, vor allem aber auch in den USA in Verbindung gebracht, sodaß es an der Entstehung des Syndroms beteiligt zu sein scheint.

Die Zytomegalieinfektion ist die gefürchtetste Infektion bei Transplantationen, sie kommt am häufigsten und gravierendsten nach allogenen Knochenmarkstransplantationen vor. Ihre wichtigste Manifestation ist hier eine interstitielle Pneumonie mit einer Inzidenz von 20% und einer Mortalität von über 80%. Die Inzidenz der HCMV Pneumonie nach syngener Transplantation liegt hingegen weit geringer und keine der Pneumonien nach syngener Transplantation ist mit HCMV assoziiert worden. Über die Pathogenese dieser Infektion ist bisher wenig bekannt (Ho, 1982; Hirsch, 1984).

Bei Nierentransplantatempfängern liegt die Inzidenz einer HCMV Infektion bei ca. 90%. Die Infektionen treten meist erst ab dem 35. Tag nach der Operation auf, sie sind aber dann von chronischer Virämie und Virurie begleitet. Die Morbidität und Mortalität solcher Krankheitsbilder sind beträchtlich. Ho et al. (1975) und Betts et al. (1975) zeigten, daß das Virus hauptsächlich durch die Spenderniere übertragen wird, obgleich auch Infektionen durch Bluttransfusionen oder durch endogene Reaktivierung vorkommen. Lang (1972) hat postuliert, daß das Virus in proliferierenden Leukozyten enthalten sei. Pass et al. (1978) haben die "graft vs. host"-Reaktion für den Ausbruch der Infektion verantwortlich gemacht, während

Naraqi et al. (1977) die Rolle der immunsuppressiven Therapie betonten. Des weiteren berichten Dowling et al. (1976), daß zytotoxische, immunsuppressive Therapie allein unter Umständen den Patienten für eine HCMV-Infektion sensibilisiert.

Im allgemeinen wird durch eine HCMV Infektion das Immunsystem supprimiert, was nicht selten zu Superinfektionen durch Pilze (Z.B. Aspergillus, Mucoraceae), Protozoen (z.B. Pneumocystis carinii) oder Bakterien führt.

2. Die Immunantwort des menschlichen Organismus

2.1. Zelluläre und humorale Immunität

Neben einer genetisch determinierten "natürlichen Resistenz" besitzt der menschliche Organismus die Fähigkeit, auf Antigenkontakte mit der Aktivierung unspezifischer und spezifischer Abwehrfunktionen zu antworten mit dem Ziel, eingedrungene Krankheitserreger zu eliminieren und somit Infekte abzuwehren. Prinzipiell läßt sich hier eine Unterteilung in humorale und zelluläre Immunität treffen (Übersicht bei Resch, 1977).

Die Träger der humoralen Immunität sind die B-Lymphozyten, die nach Antigenkontakt zu Plasmazellen ausreifen und die Antikörper sezernieren. Die Aufgaben der spezifischen zellulären Immunität fallen hingegen den T-Lymphozyten zu. Sie unterscheiden sich von den B-Zellen aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften (Differenzierungsantigene) (Kung et al., 1979; Reinherz et al., 1979; Royston et al., 1980).

Lymphozyten sind im Ruhezustand kleine, stoffwechselarme Zellen. Sie sind als Träger der spezifischen Immunabwehr mit Hilfe spezifischer Oberflächenrezeptoren in der Lage, Fremdstoffe zu erkennen und auf sie zu reagieren. Nach

Antigenkontakt nimmt die Stoffwechselaktivität in der aktivierten Zelle zu, Lymphozyten entwickeln sich zu Lymphoblasten, teilen sich und bilden neue Zellfunktionen aus. Sie differenzieren sich aus Stammzellen des Knochenmarks, die noch keine immunologische Kompetenz besitzen und sich nach der Geburt autonom vermehren. Man unterscheidet zwischen thymusabhängigen (T-)Lymphozyten und thymusunabhängigen (B-)Lymphozyten. Ein Teil der oben genannten Stammzellen wandert in den Thymus ein, wo über eine Vielzahl von Differenzierungsteilungen die Reifung zu T-Lymphoyzten erfolgt. Mit dem Blutstrom verlassen die nun immunkompetenten Zellen den Thymus und siedeln sich in den peripheren lymphatischen Organen an (Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques) und stellen den größten Teil der im Blut rezirkulierenden Lymphozyten dar.

Stammzellen aus dem Knochenmark können zu B-Lymphozyten heranreifen. Bei Vögeln findet diese Differenzierung in der sog. Bursa Fabricii statt, die im Aufbau dem Thymus ähnlich ist. Bei den Säugetieren fehlt ein entsprechendes, anatomisch lokalisierbares Organ. Bei ihnen erfolgt die Differenzierungsreifung vermutlich disseminiert im Knochenmark. Die immunologisch kompetenten B-Zellen gelangen über die Blutbahn ebenfalls in die peripheren lymphatischen Organe. Dort siedeln sie sich bevorzugt in den Keimzentren (Lymphknoten) bzw. der weißen Pulpa (Milz) an.

B-Zellen sind nach Antigenkontakt und anschließender Entwicklung zu Plasmazellen in der Lage, Antikörper verschiedener Klassen zu produzieren. Chemisch stellen Antikörper Glykoproteine mit einer charakteristischen Struktur dar, weshalb man sie auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet. Es gibt 5 verschiedene Klassen von Immunglobulinen: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Bei einer ersten Immunisierung wird IgG zeitlich später als IgM gebildet, dafür aber in höherer Konzentration. Bei einer Sekundärreaktion kommt es hingegen fast ausschließlich

zur IgG-Bildung. Da es beim Menschen als einziges Immunglobulin Membranen passieren kann, vermag es durch die Plazenta in den Kreislauf des ungeborenen Kindes zu gelangen und dadurch den Neugeborenen Schutz in den ersten Lebensmonaten vor Infektionen zu verleihen.

IgM ist der größte Antikörper, der über zehn Antigen-Bindungsstellen verfügt und deshalb wirksamer als IgG ist. Er tritt bei Erst-Immunisierung zuerst auf ("Sorfort-Antikörper"), doch sinkt die Konzentration schnell wieder ab, während IgG später gebildet wird. IgA ist auf Abwehrvorgänge in den Schleimhautoberflächen spezialisiert. T- und B-Lymphozyten lassen sich morphologisch nicht unterscheiden. Eine Unterscheidung ist aber aufgrund verschiedener Oberflächeneigenschaften möglich. Menschliche T-Lymphozyten können z.B. Schafserythrozyten binden und sind dann als sogenannte Rosetten mikroskopisch leicht erkennbar. B-Lymphozyten tragen membranständige Immunglobuline und können über fluoreszierende Anti-Immunglobulin-Antikörper identifziert werden. Weitere Unterscheidungsmöglichkeiten, auch in Subpopulationen, sind durch Antiseren gegen verschiedene Differenzierungsantigene gegeben, bei T-Lymphozyten das Ly-System (Maus) oder das OKT-System (Mensch), und beispielsweise Fc-Rezeptoren und Ig-Klassen bei B-Lymphozyten.

Immunkompetente B- und T-Lymphozyten besitzen eine hohe Spezifität für Antigene. Aus der Vielzahl der Lymphozyten reagieren nur diejenigen Abkömmlinge einer Zelle (Klon), die einen Rezeptor für dieses Antigen aufweisen. Diese oberflächenassoziierten Erkennungsstrukturen sind genetisch bestimmt und werden daher ohne Kontakt mit dem entsprechenden Antigen während der Entwicklung des Immunsystems ausgebildet (Klonale Selektionstheorie von Burnet, 1959). Das Antigenerkennungsvermögen der B-Lymphozyten ist an immunglobulinartige Oberflächenrezeptoren gebunden; die T-Lymphozyten können aufgrund ihrer verschiedenen Membranantigene unterschieden werden. Es handelt sich hier

um Membranglykoproteine, die mit Hilfe monoklonaler Antikörper erkannt werden. Der Teil des variablen Endes, durch dessen Struktur die Spezifität bestimmt wird (Idiotyp), weist sehr starke Homologien mit dem entsprechenden Idiotyp eines Antikörpers auf (idiotypische Kreuzreaktivität) (Tab. 1).

Tabelle 1. Membranantigene auf T-Zellen

Antigen	T-Zell-Population	Antikörper	Handelsname
T11	alle	anti-T11	OKT11, Leu 5
T1	reife T-Zellen	anti-T1	OKT1, Leu 1
T3	"	anti-T3	OKT3, Leu 4
T12	"	anti-T12	
T4	Helfer-/Induktorzellen	anti-T4	OKT4, Leu 3a
TQ1	"	anti-TQ1	
T8	Suppressor-/zytotoxische Zellen	anti-T8	OKT8, Leu 2a Leu 2b
T5	"	anti-T5	
T10	aktivierte T-Zellen	anti-T10	
Tac	"	anti-Tac	

Zellklone mit Rezeptoren für eine Antigenstruktur differenzieren sich bei der Sensibilisierung mit diesem Antigen zu Effektorzellen und langlebigen Gedächtniszellen, die im Organismus zirkulieren und nach erneutem Antigenkontakt sehr schnell spezifische Funktionen aufnehmen können, z.B. eine erhöhte Bildung von Effektorzellen ("Immunologisches Gedächtnis").

T-Zellen sind zum einen für die zelluläre Immunantwort, zum anderen für die Regulation der humoralen Immunität verantwortlich. Die verschiedenen Funktionen und T-Zell-vermittelten Immunreaktionen sind in Tabelle 2 aufgeführt:

Tabelle 2. T-Zell-Funktionen und T-Zell-vermittelte Immunreaktionen nach Antigenkontakt spezifisch sensibilisierter Zellen

T-Zell-Funktionen	T-Zell-vermittelte Immunreaktion
T-Zell Zytotoxizität (Lymphotoxin)	Zytotoxizität: Viren, Pilze, Tumorzellen akute Transplantatabstoßung akute Graft-versus-Host Reaktion
T-Helfer-Funktion	Synthese spezif. IgG/IgA Antikörper durch B-Lymphozyten; Steigerung der T-Zell Toxizität
Koloniestimulierender Faktor (CSF)	hämatopoietische Stammzellproliferation
T-Suppressor-Funktion	Kontrolle der B-Zell Funktion Kontrolle der T-Zell Funktion Kontrolle der Hämatopoiese
Interleukin II Synthese	Steuerung der T-Zell Aktivierung und klonalen Proliferation
T-Antisuppressor Funktion	Neutralisation der T-Suppressor-Zellen

Nach Antigenkontakt auf andere Zellen (z.B. Tumor- oder virusinfizierte Zellen) bildet eine Subpopulation zytotoxische Zellen aus (Trinchieri et al., 1973). Diese Zellen haben die Aufgabe, Zellen zu lysieren, die entweder ein allogenes Histokompatibilitäts-Antigen tragen (Transplantatabstoßung) oder die Fremdantigene exprimieren, gegen die diese Effektorzellen sensibilisiert sind (Virus- oder Bakterienantigene).

Desweiteren gibt es Regulatorzellen, die sich aus zwei verschiedenen Subpopulationen zu Helfer- bzw. Suppressorzellen in B- und T-zellabhängigen Immunreaktionen entwickeln, die unterstützend bzw. supprimierend in die Antikörperbildung der humoralen Immunität und die Generation zytotoxischer Lymphozyten eingreifen. Suppressor-T-Lymphozyten können auch die Ausbildung zellulärer Immunreaktionen vermindern (Cerottini und Brunner, 1974). Zu den T-Zell-Funktionen gehört auch die Interleukin II- oder T-Zellen-Wachstumsfaktor (TCGF)-Synthese aus Makrophagen-aktivierten T-Lymphozyten (Schreier et al., 1980).

Die Sensibilisierung mit einem Antigen führt zur Aktivierung und Proliferation einer nur begrenzten Zahl von Lymphozyten, nämlich derjenigen, die Rezeptoren mit hoher Affinität für das betreffende Antigen besitzen. Mit polyklonalen Immunstimulantien, sog. Mitogenen, können Lymphozyten unspezifisch und daher in großer Zahl stimuliert werden. Es gibt B- und T-Zellmitogene, zu den typischen Vertretern der T-Zellmitogene gehören die Pflanzenlektine Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA). Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien stimulieren B-Lymphozyten, während Pokeweed Mitogen (PWM) beide Hauptklassen, B- und T-Lymphozyten stimuliert.

Die Aktivierung von Lymphozyten führt nicht nur zu Zellwachstum und -teilung, sondern auch zu einer Differenzierung mit der Ausbildung neuer Zellfunktionen. Die Lymphozytenstimulation mit Mitogenen bietet sich aus verschiedenen Gründen als ein geeignetes Modell an, um Mechanismen der Zellaktivierung und -differenzierung zu studieren:

- Lymphozyten sind auch in vivo einzelne Zellen, die sich in vitro unter definierbaren Bedingungen kultivieren lassen.
- Ruhende Lymphozyten werden durch Mitogene in großer Zahl gleichzeitig aktiviert, und sequentielle Veränderungen können vom Zeitpunkt der Mitogenzugabe an beobachtet werden.
- Aufgrund verschiedener Beobachtungen wird die Aktivierung von T-Lymphozyten durch verschiedene Liganden (Antigene, Mitogene) wahrscheinlich über einen gemeinsamen konstanten Teil der Rezeptorstrukturen vermittelt (Greaves, 1975; Wekerle et al., 1975; Fanger et al., 1972).

2.1.1. Unspezifische Abwehrmechanismen

Die unspezifischen Abwehrmechanismen stellen die ersten Reaktionen des Körpers gegen primäre Infektionen dar. Diese unspezifischen Mechanismen, die bereits präformiert (z.B. Makrophagen), oder aber schnell induzierbar (z.B. Interferone) sind, treten auch bei Virusinfektionen schon in frühen Phasen der Invasion auf. Sie sind daher von entscheidender Bedeutung für den weiteren Verlauf der Infektion, d.h. ob oder in welchem Ausmaß Virusvermehrung und -ausbreitung stattfindet. Falls erforderlich, gelingt die endgültige Überwindung der Infektion dann mit Hilfe des Immunsystems. Bei Sekundärinfektionen spielt dagegen nach den rasch reagierenden unspezifischen Mechanismen die spezifische Abwehr zeitlich schon früher eine Rolle, weil dann aufgrund des "immunologischen Gedächtnisses" die Immunfunktionen viel früher aktiviert werden.

Neben den erwähnten aktiven Abwehrmechanismen gehört auch die unspezifische, genetisch bedingte Restriktion der Virusvermehrung auf Rezeptorebene zur potentiellen Abwehr des Körpers. So hat beispielsweise Bang (1978) die Bedeutung der Genetik bei Virusinfektionen in verschiedenen Mausmodellen zusammengefaßt dargestellt. Beim Menschen sind allerdings bis jetzt wenig Einzelheiten über die genetisch bedingte Resistenz gegen Virusinfektionen bekannt.

In mehreren Studien ist die Rolle der Makrophagen bei der Virusabwehr untersucht worden (Mogensen, 1979; Morahan und Morse, 1979), z.B. schützt Corynebacterium parvum, welches Makrophagen aktivieren kann, Mäuse vor der HSV-induzierten Enzephalitis (Kirchner et al., 1977). Ebenso wie die oben beschriebenen Lymphozyten entwickeln sich auch Makrophagen aus Stammzellen des Knochenmarks. Als funktionstüchtige Monozyten erreichen sie über die Blutbahn Organe und Gewebe, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren. Sowohl im Rahmen der Immunantwort (z.B. bei der Aktivierung von T-Zellen oder bei der T- und B-Zellkooperation), als auch bei unspezifischen Abwehrvorgängen (Phagozytose oder direkte Zytotoxizität) nehmen sie wichtige Funktionen wahr.

Ein anderer lymphoider Zelltyp, der bei Untersuchungen zur natürlichen, zellvermittelten Zytotoxizität entdeckt wurde, hat in den letzten Jahren große Beachtung gefunden. Da die Zellen dieser Population im Gegensatz zu T-Lymphozyten spontan, d.h. ohne vorherige Sensibilisierung, in der Lage sind, bestimmte Zielzellen (sog. Target-Zellen) zu lysieren, werden sie als Natürliche (Natural) Killer (NK)-Zellen bezeichnet (Herberman und Holden, 1978). NK-Zellen besitzen die Fähigkeit, natürliche Resistenz gegen Tumoren sowie gegen Virus- und andere Infektionskrankheiten zu vermitteln. Desweiteren wird ihnen eine wichtige Rolle bei der sog. "Immunüberwachung" (Immunsurveillance) zugeschrieben.

2.1.2. Interferone

Ein weiteres System der unspezifischen Abwehr stellen die Interferone dar (Übersicht siehe Stewart II, 1979). Interferone sind eine Gruppe von Proteinen und Glykoproteinen, die von menschlichen und tierischen Zellen nach Stimulation mit geeigneten Induzenten gebildet wird. Das Wirkungsprinzip der Interferone wurde bereits 1957 von Isaacs und Lindenmann entdeckt. Sie stellten fest, daß Interferone die Mediatormoleküle der "viralen Interferenz" sind. Darunter versteht man das Phänomen, daß sich nach einer Erstinfektion ein zweites, unterschiedliches Virus nicht oder nur begrenzt vermehren kann (Isaacs und Lindenmann, 1957). Inzwischen ist eine ganze Gruppe von Interferonen bekannt, weshalb man von dem Interferonsystem spricht.

Nach der zur Zeit gültigen Nomenklatur werden Interferone in drei Gruppen eingeteilt (Stewart II et al., 1980):

1. Alpha-Interferon (IFN-α)
2. Beta-Interferon (IFN-β)
3. Gamma-Interferon (IFN-γ)

IFN-α wird auf viralen Stimulus von Leukozyten gebildet. Natives humanes IFN-α stellt ein natürliches Gemisch einer Anzahl von Interferonen dar. Alpha-Interferone haben ein Molekulargewicht von 16-20.000 Dalton und sind weniger Spezies-spezifisch als andere Interferone. Ein weiteres wichtiges Kriterium der Alpha-Interferone ist ihre Säurestabilität bei pH 2.

IFN-β wird auf viralen Stimulus von Fibroblasten gebildet. Induziert wird das IFN-β durch Viren oder in vitro durch synthetische Induzenten wie die doppelsträngige RNS Polyinosylpolycytidylsäure (PolyI-PolyC). Das humane IFN-β besitzt ein Molekulargewicht von 20-25.000 Dalton. Es zeigt im Gegensatz zu Alpha-Interferonen eine hohe Speziesspezifität und ist ebenfalls säurestabil bei pH 2.

IFN-γ (früher auch Immuninterferon genannt) wird von einer Subklasse der Leukozyten, den T-Lymphozyten auf verschiedene Stimuli (spezifische Antigene, Mitogene oder Alloantigene) gebildet (Friedman und Cooper, 1967). Das IFN-γ ist deutlich verschieden von den bisher beschriebenen Alpha- und Beta-Interferonen (Übersicht Kirchner, 1984). Es stellt den Prototyp zweier wichtiger Substanzklassen dar, den Lymphokinen und den Interferonen. Bisher ist nur ein Gen für IFN-γ beschrieben, das native Protein besitzt ein Molekulargewicht von 50.000 Dalton. Es konnten keinerlei strukturelle Ähnlichkeiten zu den anderen Interferonen nachgewiesen werden; ein wesentlicher Unterschied besteht auch in den physikochemischen Eigenschaften, da IFN-γ durch Säurebehandlung bei pH 2 inaktiviert wird. IFN-γ besitzt eine strenge Speziesspezifität, menschliches Interferon zeigt keinerlei Aktivität auf Zellen einer anderen Spezies (De Ley et al., 1980).

Interferone zeigen eine Reihe vielfältiger biologischer Aktivitäten auf:

1. Interferone beeinflussen in vielfältiger Weise immunologische Reaktionen, z.B. aktivieren sie zelluläre Komponenten des Immunsystems. Die Fähigkeiten von NK-Zellen, Tumorzellen zu zerstören wird gesteigert, ebenso die Fähigkeit von Makrophagen, Viren oder Bakterien zu phagozytieren (Donahoe et al., 1976). Gleichzeitig wird ihre Zytotoxizität gegen Tumorzellen und die Produktion von Mediatormolekülen erhöht (Arenzana-Seisdedos et al., 1983). Desweiteren werden Zellmembranen durch Interferone in ihrer Oberflächenstruktur verändert, die Expression von Oberflächenantigenen verstärkt und die Antikörperbildung durch B-Zellen von Interferonen dosis- und zeitabhängig modifiziert (Brodeur et al., 1974).

2. Eine Hemmung des Zellwachstums konnte in einer Vielzahl von Zellsystemen nachgewiesen werden, so bei gebräuchlichen Laborzellinien, wie auch bei Tumorzellen und transformierten Zellinien (Paucker et al., 1962).

3. Zellen entwickeln unter Interferoneinfluß antivirale Aktivität und werden gegen eine nachfolgende Infektion mit einer Vielzahl verschiedener Viren geschützt, indem die Virusvermehrung gehemmt wird. Diese Hemmung erfolgt an verschiedenen Punkten des Replikationszyklus, und ihr liegen wahrscheinlich mehrere antivirale Mechanismen zugrunde. Interferone wirken jedoch nie auf das Virus selbst, sondern ausschließlich auf die Zelle, welche in einen Zustand erhöhter Abwehrbereitschaft versetzt wird, sodaß das Interferon ein unspezifisches generelles Abwehrprinzip darstellt (Übersicht bei Jacobsen und Kirchner, 1985).

II. ZIELSETZUNG

Infektionen mit Zytomegalie Virus und Herpes Simplex Virus verlaufen beim Menschen meist subklinisch und werden nur am Auftreten von Antikörpertitern erkannt, d.h., sehr viele Menschen tragen diese Viren in sich, ohne je ernsthaft zu erkranken. Dennoch gibt es generalisierte Infektionen durch CMV und HSV. Diese kommen häufig in Patienten vor, deren Immunsystem entweder noch nicht ausgereift ist, also bei Neugeborenen, oder deren Immunsystem in seiner Funktion beeinträchtigt ist. Dies ist der Fall bei Bluttransfusionen, Immundefekten, Transplantationen, bei Therapie mit Immunsuppressiva und bei malignen Tumoren. Neben der humoralen Immunität kommt bei der Abwehr von Infektionen durch diese Herpesviren der zellulären Immunität eine entscheidende Bedeutung zu. Klinische Untersuchungen, die nur die humorale Immunitätslage berücksichtigen, können deswegen nur einen unzureichenden Einblick in die Pathogenese solcher Infektionen geben. Im Gegensatz zu der Situation bei der Antikörperbestimmung sind die bisherigen Methoden zur Erfassung der zellulären antiviralen Immunabwehr jedoch nicht allgemein anwendbar und für den Einsatz in der Routinediagnostik nicht geeignet. Für diesen Zweck sollte nun ein Testsystem entwickelt werden.

Von Kirchner et al. (1982) wurde ein Testsystem beschrieben, welches allerdings nur zur Austestung der Interferonproduktion in menschlichen Leukozyten nach Stimulation mit unspezifischen Mitogenen entwickelt worden war. Das hier zu entwickelnde Testsystem zur Messung der antiviralen zellulären Immunität mußte einfach sein, um in der klinischen Routine größere Gruppen von Patienten untersuchen zu können. Mit diesem Test sollten sowohl Untersuchungen der Lymphoproliferation als auch Untersuchungen zur Interferonproduktion möglich sein. Eine wichtige Forderung war, daß in dieser Technik sowohl unspezifische Stimulantien, wie Mitogene zur Messung der allgemeinen zellulären Immunitäts-

lage als auch virale und bakterielle Antigene zur Messung der spezifischen antiviralen und antibakteriellen zellulären Immunität eingesetzt werden konnten.

Eine weitere wichtige Forderung wurde an die Durchführung des Testsystems gestellt. Sie sollte vergleichsweise zu den bisherigen Methoden einfach sein und die bekannten Nachteile der bisherigen Methoden, insbesondere den hohen Material- und Zeitaufwand, vermeiden. Von Bedeutung war auch, daß nur eine sehr geringe Blutmenge, ca. 1-2 ml Vollblut benötigt wurde, was vor allem zur Untersuchung von Säuglingen und Kleinkindern wichtig ist. Weiterhin sollten die in vivo Verhältnisse der zellulären Bestandteile des Blutes erhalten bleiben, d.h., durch die Nichtauftrennung des Vollbluts eine Verschiebung der Leukozytenpopulation verhindert werden. Zwar wurden in der Literatur schon Vollbluttechniken zur Untersuchung der HSV-, also viral-induzierten Lymphoproliferation beschrieben (Russel, 1973; El Araby et al., 1978), aber die dort beschriebenen positiven Ergebnisse mit viralen Antigenen im Vollbluttest konnten nicht nachvollzogen werden.

Somit war das Ziel dieser Arbeit, für die Routinediagnostik ein Testsystem - die Vollbut-Technik - zu entwickeln, mit der es möglich war, die zelluläre Immunitätslage verschiedener Patientengruppen zu untersuchen. Ein besonderes Gewicht wurde Patientengruppen beigemessen, die gefährdet waren, sich einer CMV- und/oder HSV-Infektion auszusetzen, die, wie oben schon beschrieben wurde, zu schwerwiegenden Komplikationen führen kann.

III. MATERIAL

1. Gewebekulturbedarf

Gewebekulturflaschen, 50 ml, No. 3013, Falcon Plastics, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Gewebekulturflaschen 250 ml, No. 3024, Falcon Plastics, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Mikrotiter-Platten mit Flachboden, No. 67008, Nunc, Dänemark

Mikrotiter-Platten mit Rundboden, No. 63320, Nunc, Dänemark

Zentrifugenröhrchen, 50 ml, No. 2070F, Falcon Plastics, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Zentrifugenröhrchen, 6 ml, No. 2054, Falcon Plastics, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Eppendorf-Zentrifugenröhrchen, 1,5 ml, No. 3810, Eppendorf, Hamburg

Ultrazentrifugenröhrchen, polyallomer, Beckman, USA

Sarstedt Röhrchen, 10 ml, No. 26323, Sarstedt, Nürmbrecht

Kulturröhrchen, 13 ml, No. 3033, Falcon Plastics, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Petrischalen, No. 633 171, Greiner, Nürtingen

Petrischalen, No. 3002F, Falcon Plastics, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Kulturplatten, 24-Loch, Linbro, No. 7603305, Flow Laboratories, Meckenheim

ELISA-Mikrotiterplatten, Linbro, No. 763804, Flow Laboratories, Meckenheim

Biotips-Pipettenspitzen mit Pipette, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Viererband Pipettenspitzen, Titertek, Flow Laboratories, Meckenheim

Multichannel Finnpipette 0,05-0,2 ml, Titertek, Flow Laboratories, Meckenheim

Gilson Pipetten 20 µl und 200 µl mit Pipetten, Abimed, Düsseldorf

Millex Membranfilter, 0,22 µm und 0,45 µm, Millipore, Molsheim, Frankreich

Einmal-Filterhalter, 0,2 µm, No. 462200, Schleicher & Schüll, Dassel

Leuko-Pak, Leukozyten-Filter, No. 4c 2401, Fenwal, Div. of Travenol, Deerfield/ Illinois, USA

Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,100 mm, 0,0025 mm^2, Dosch, Heidelberg

Einmalküvetten, Greiner, Nürtingen

Whatman Mikrofiberglas-Filter, Whatman Ltd., Maidstone, England

Titertek Filterpapier, Dunn, Asbach

2. Geräte

Skatron Absauggerät, Flow Laboratories, Meckenheim

Liquid Scintillation Counter Mark II, Searle Analytics, Nuclear Chicago GmbH, Heusenstamm

Coulter Counter, Modell ZBi, Coulter Electronics Ltd., Dunstable, England

Spektralphotometer PM6, Zeiss, Oberkochen

Photometer, Titertek, Flow Laboratories, Meckenheim

Inkubator, Modell No. 3029, Forma Scientific, Labotect, Göttingen

Inkubator SteriCult, Forma Scientific, Labotect, Göttingen

Exsiccator, Nalge/Synbron, USA

Digital-pH-Meter E532, Methrom, Herisau, Schweiz

Gelelektrophoresekammer für DNA-Gele, hauseigene Herstellung

Spannungsgeräte, Fischer, Heidelberg

Sterilbank BioGard Hood, The Baker Company Inc., Labotect, Göttingen

Mikrodispenser, Multispencer 10, Brand, Wertheim/Main

Mikroskope:

Diavert, Leitz GmbH, Stuttgart

Dialux, Leitz GmbH, Stuttgart

Orthoplan, Leitz GmbH, Stuttgart

Waagen:

Sartorius 1216 MP, Sartorius, Göttingen

Sartorius 2002 MP1, Sartorius, Göttingen

Zentrifugen:

Zentrifuge CRV 5000, Damon/IEC Division

Airfuge, Beckman Instruments GmbH, München

Wifug Tischzentrifuge, Wifug, Elmult, Schweden

Shandon Elliot Zytozentrifuge, Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt

Eppendorf Zentrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg

Minifuge 2, Heraeus-Christ, Osterode

Ultrazentrifuge Modell L5.50, Beckman, USA

Rotoren:

Rotor SW27, Beckman Instruments, München

Rotor SW50, Beckman Instruments, München

Rotor Ti50, Beckman Instruments, München

Tiefkühlschränke:

Colora UF85-3005, Colora, Lorch

Forma Bio-Freezer, Forma Scientific, Labotect, Göttingen

Rührmotor mit Heizplatte, Heidolph, Kelheim

Mixer No. 5432, Eppendorf, Hamburg

Wasserbad, No. 3042, Kottermann, Hänigsen

Pipetboy, Tecnomara, Zürich, Schweiz

Easy Touch Bunsenbrenner, Labotect, Göttingen

3. Reagenzien

3.1. Fertige Reagenzien

Agarose	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cäsiumchlorid	Roth, Karlsruhe

Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DNS-Polymerase I	BRL, Neu-Isenburg
DNase I	BRL, Neu-Isenburg
EDTA	Merck, Darmstadt
En^{3}Hance	New England Nuclear, Boston, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, München
Formalin conc. 37%	Merck, Darmstadt
Fungizone	Gibco Europe, Karlsruhe
Gentamycin No. A2712	Seromed Biochrom, Berlin
Humanserum, Standard	Behringwerke, Marburg
Interferon-Standard NIH G002-904511	National Institutes of Health, USA
Interferon-Standard Ro 22-8181/601	Hoffmann-LaRoche, Basel
Isoton II	Coulter Electronics, Krefeld
Kalbsthymus DNA	Boehringer, Mannheim
Kristallviolett, No. 42555	Merck, Darmstadt
Lambda DNS	BRL, Neu-Isenburg
Lymphoprep (Sodium Metrizoate/ Ficoll Lösung)	Nyegaard, Oslo, Norwegen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methylenblau B, No. 1283	Merck, Darmstadt
Methylengrün, No. M8884	Sigma, München
Neomycin	Gibco Europe, Karlsruhe
Neuraminidase (Mucopolysaccharide-N-acetyl-neuroaminylhydrolase, 1 ml = 500 IU)	Behringwerke, Marburg

Ortho-Phenylendiamin, OPD, No. 3888	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin No. A2212	Seromed Biochrom, Berlin
Permablend	Packard, Zürich, Schweiz
Phenol	Merck, Darmstadt
PhiX RF-DNS (Hae III-Fragment)	BRL, Neu-Isenburg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzym: Hind III	BRL, Neu-Isenburg
Rotiszint 11	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Dodecylsulfat Na-Salz)	Serva, Heidelberg
Methyl-^{3}H Thymidin	Amersham Buchler, Braunschweig
Toluol	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Serva, Heidelberg
Trypanblau, No. 11732	Merck, Darmstadt
Trypsin Trockensubstanz, No. 840-7068	Difco, Detroit, USA
Zaponin	Coulter Electronics, Krefeld
Ziege-Anti-Human-IgG (GaHuIgG), No. 4100	Medac, Hamburg
dto., Peroxidase-konjugiert, No. 2390	Medac, Hamburg
Ziege-Anti-Human-IgM (GaHuIgM), No. 4103	Medac, Hamburg
dto., Peroxidase-konjugiert, No. 2392	Medac, Hamburg

3.2. Puffer und Lösungen

Assaypuffer für Restriktionsenzyme:

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

10 mM $MgCl_2$

50 mM NaCl

Hepes-Puffer:

8,00 g NaCl

0,37 g KCl

0,125 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$

1,0 g Dextrose

5,0 g Hepes

1000,0 ml Aqua bidest ad

pH 7,05

PBS (Phosphate-buffered solution):

0,12 M NaCl

0,018 M $NaHPO_4$

0,0025 M KH_2PO_4

pH 7,2

Phenolpuffer:

80% Phenol

0,2 g Hydroxychinolin

0,1 M Tris

0,01 M EDTA (pH 7,5)

1x SSC (Natriumchlorid-Natriumcitrat):

0,15 M NaCl

0,015 M NaCitrat

TBS (Tris-buffered saline):

0,05 M Tris-HCl, pH 7,4

0,15 M NaCl

TE-Puffer:

10 mM Tris

1 mM EDTA (pH 8,0)

TNE-Puffer:

10 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

1 mM EDTA

pH 7,8 oder 8,0

Szintillationsflüssigkeit:

14 g Permablend

ad 2,5 l Toluol

unter langsamem Rühren über Nacht lösen

DNA-Puffer:

1 M Tris

0,5 M EDTA

pH 7,2

Elektrophoresepuffer für DNA-Gele:

40 mM Tris-Acetat

2 mM EDTA

pH 8,0

Farbmarker für DNA-Gele:

50% Saccharose

1 mg/ml Xylencyanol

1 mg/ml Bromphenolblau

1 mg/ml Orange G

Färbelösung für DNA-Gele:

0,5 µg/ml Ethidiumbromid

Puffer für neutrale CsCl-Dichtegradienten:

0,02 M Tris-HCl

0,002 M EDTA

pH 7,5

Substratpuffer für ELISA:

100 mg OPD

90 ml 0,11 M $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$

10 ml 0,5 M Zitronensäure-1-Hydrat

100 µl Perhydrol 30%

4. Materialien für die Zellkultur

4.1. Lösungen

Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)

Zusammensetzung in	mg/Liter
NaCl	8000
KCl	400
Na_2HPO_4	48
KH_2PO_4	60
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	200
$CaCl_2$	140
Glucose	1000
Phenolrot	10
$NaHCO_3$	350

Die Lösung wird mit 7,5%iger $NaHCO_3$-Lösung auf pH 7,3 eingestellt.

Trypsin Versen Lösung

Zusammensetzung in	mg/100 ml
Trypsin Trockensubstanz	50
Na_2-EDTA	20
Na_2-HPO_4	1150
KH_2PO_4	200
KCl	200
NaCl	8000
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	100
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	100

4.2. Seren und Medienzusätze

Humanes AB-Serum	Gibco, Karlsruhe
Kälberserum (KS)	Gibco, Karlsruhe
Foetales Kälberserum (FCS bzw. FBS)	Gibco, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA bzw. RSA)	Boehringer, Mannheim

Seren wurden mit Ausnahmen zur Kultivierung von HEL Zellen 45 min bei 56°C komplementinaktiviert. Alle Seren wurden aliquotiert und dann bei -20°C gelagert.

Nicht-essentielle Aminosäuren 100x, No. 02943	Seromed, München
Glutamin	Seromed, München

4.3. Medien

Kulturmedien

Folgende Kulturmedien wurden verwendet:

Name	Abkürzung	Bezugsquelle
Basal medium Eagle	BME	No. T 021, Seromed Biochrom, Berlin
Minimum Essential Medium (Eagle)	MEM	No. T 031, Seromed Biochrom, Berlin
Dulbecco's MEM Modifikation	D-MEM	No. T 041, Seromed Biochrom, Berlin
RPMI-1640-Medium	RPMI	No. 041-1875 Gibco Europe, Karlsruhe
Medium 199	M199	No. F0615, Seromed Biochrom, Berlin

Die Medien RPMI 1640 und M199 wurden als Flüssigmedien bezogen. Die anderen wurden aus den jeweiligen Trockenmedien frisch hergestellt.
Allen Medien wurde Penicillin 100 IE/ml, Streptomycinsulfat 100 IE/ml und L-Glutamin 100 mM zugesetzt.

Zellkulturmedium

RPMI 1640	500 ml
L-Glutamin (100 mM)	5 ml
Gentamycin	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Fötales Kälberserum	2,5%

Medium zum Einfrieren von adhaerent wachsenden Zellen

BME	60%
FCS	20%
Glycerin	20%

Medium zum Einfrieren von Suspensionskulturen

RPMI 1640	70%
FCS	20%
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	10%

CMC-Medium

Folgende Lösung wurde unter Erwärmung hergestellt:

Carboxymethylcellulose Na-Salz	2,3 g
Aqua dest.	100,0 ml

Die Lösung wurde durch Autoklavieren sterilisiert, dann Zusatz von:

BME doppelt konzentriert	100,0 ml
FCS	2,0 ml
L-Glutamin-Lösung (100 mM)	2,0 ml
Penicillin-Streptomycin (10.000 IE/ml/10.000 IE/ml)	2,0 ml

Einstellung auf pH 7,2 mit 7,5%iger $NaHCO_3$-Lösung.

5. Gewebezellkulturen

Zusammensetzung der verwendeten Gewebezellkulturen

Bezeichnung	Ursprung	Kulturmedium	Verwendung
HEL 299 (Human Embryonal Lung Fibroblast)	embryonales Lungengewebe, Mensch	BME, 10% FCS	CMV-Vermehrung
RITA (African Green Monkey)	Affennieren	MEM, 7% FCS	HSV-Vermehrung
CV-1 (African Green Monkey)	Affennieren	BME, 10% FCS	VSV-Vermehrung
WISH	Amnionzellen, Mensch	BME, 15% FCS	IFN-Test, Mensch
HEp-2	Epidermoides Larynxkarzinom, Mensch	BME, 15% FCS	IFN-Test, Mensch

6. Stimulantien

6.1. Virusstämme

Bezeichnung	Stamm	Titer (PFU/ml)
CMV Zytomegalie Virus	AD 169	1×10^6
CMV Zytomegalie Virus	Davis	1×10^6
HSV-1 WAL Herpes Simplex Virus Typ 1	WALCH	1×10^7
VSV Vesicular Stomatitis Virus	Indiana	1×10^8
NDV Newcastle Disease Virus	Kumarov	5×10^5

6.2. Bakterielle Antigene

Tuberculin PPD (purified protein derivate), ein Recall-Antigen (Statens Seruminstitut, Kopenhagen, Dänemark)

Corynebacterium parvum; Stamm CN 6134; abgetötete Bakteriensuspension Burroughs Wellcome, Beckenham, England)

6.3. Antikörper

OKT 3; monoklonaler Anti-T-Zell Antikörper (Ortho diagnostics, Heidelberg)

6.4. Mitogene

Bezeichnung	Herkunft	Spezifität	Bezugsquelle
PHA Phytohämag-glutinin	Pflanzenlektin aus den Samen von Phaseolus vulgaris	T-Zell Mitogen	Burroughs Wellcome, Großwedel
Con A Concanavalin A	Pflanzenlektin aus den Samen von Canavalia ensiformis	T-Zell Mitogen	Pharmacia, Uppsala Schweden
PWM Pokeweed Mitogen	Lektin aus den Wurzeln und Blättern von Phytolacca americana	T- und B-Zell Mitogen	Gibco Europe, Karlsruhe

7. Patienten und Kontrollpersonen

7.1. Gesunde Individuen

7.1.1. Normalkollektiv

Das Normalkollektiv bestand aus 104 gesunden erwachsenen Blutspendern beiden Geschlechts und verschiedenen Alters aus der Blutspendezentrale der Chirurgie der Universität Heidelberg. Diese Gruppe diente vorweg zur Etablierung der Vollblut-Methode. Weitere Gesunde wurden dann als Kontrollen zu den verschiedenen Patientenkollektiven untersucht.

7.1.2. Nabelschnurblut

Es wurden 16 Nabelschnurblutproben untersucht, die wir freundlicherweise von der Frauenklinik St. Elisabeth, Heidelberg, erhielten.

7.1.3. Säuglinge

Desweiteren wurden sieben Säuglinge im Alter zwischen 2 und 18 Wochen aus der Kinderklinik, Heidelberg, untersucht. Sie waren dort wegen Stoffwechselstörungen stationär aufgenommen worden.

7.2. Patientenkollektive

7.2.1. Patienten mit Herzoperationen

Es wurde eine Gruppe von 45 Patienten untersucht, die sich einer Operation am offenen Herzen unterzogen hatten. Die Gruppe bestand aus 11 Frauen und 34 Männern, alle im Alter zwischen 40 und 67 Jahren. Es erfolgten entweder ein kardiopulmonaler Bypass oder eine künstliche Ersetzung der Aorten- und/oder der Mitralklappen. Eine besondere Prämedikation hatte in keinem Fall stattgefunden. Die Narkose wurde mit Thalamonal^{R} (2,5 mg/ml Droperidol und 0,05 mg/ml Fentanyl) eingeleitet, die Operationsdauer betrug zwischen 3 und 6 Stunden. Alle Patienten erhielten 3 bis 6 Blutkonserven. Von den Patienten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen und ausgetestet. Alle 45 Individuen wurden vor der Operation untersucht, 31 von ihnen eine Woche nach der Operation und 18 Patienten zwei Wochen nach der Operation. Bei jeder Blutprobe wurde die Leukozytenzahl bestimmt.

Das Kontrollkollektiv bestand aus 45 gesunden erwachsenen Blutspendern. Die Blutproben der Patienten sowie der Kontrollen wurden von der Chirurgischen Klinik, Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

7.2.2. Männliche Homosexuelle mit Lymphadenopathie-Syndrom

Die Gruppe bestand aus 32 männlichen Patienten im Durchschnittsalter von 34 Jahren. 21 von 28 Patienten hatten ein Lymphadenopathie-Syndrom,

d.h., es waren an mindestens 2 verschiedenen Körperstellen Lymphknoten zu tasten, die größer als 1 cm waren. Bei 13 von 20 ausgetesteten Patienten wurden Antikörper gegen HTLV-III im Serum entdeckt. 29 gesunde Erwachsene, 18 Frauen und 11 Männer im Durchschnittsalter von 28 Jahren, bildeten das Kontrollkollektiv. Desweiteren wurden 15 männliche Homosexuelle untersucht, die ursprünglich symptomfrei waren und zu Routineuntersuchungen in die Hautklinik der Universität Heidelberg kamen.

7.2.3. Kolonkarzinom-Patienten

Diese Patientengruppe bestand aus 108 Patienten im Alter zwischen 32 und 80 Jahren der Chirurgischen Klinik, Heidelberg. Alle 108 Personen wurden vor der Operation ausgetestet, 60 von ihnen 10 Tage nach der Operation und 35 Kolonkarzinom-Patienten wurden ein drittes Mal 3 Monate nach der chirurgischen Resektion untersucht. Die klinischen Stadien waren: 1. Kurative Behandlung, 2. Zweifelhafte Behandlung, 3. Palliative Behandlung.
Die Kontrollgruppe bestand aus 33 gesunden erwachsenen Blutspendern.

7.2.4. Schizophrenie-Patienten

Die Studie umfaßte 30 stationär behandelte Patienten (13 Frauen und 17 Männer, im Durchschnittsalter von 36 Jahren) und 30 Kontrollpersonen (15 Frauen und 15 Männer, im Durchschnittsalter von 31 Jahren). Alle Schizophreniepatienten wurden nach bestimmten psychiatrischen Kriterien klassifiziert (Moises et al., 1985); es waren alle Schizophrenieformen vorhanden. Zur Zeit der Studie hatte kein Patient klinisch apparente Infektionen. 3 Patienten erhielten keine Medikamente, 27 Patienten standen unter psychopharmakologischer Medikation wie Haloperidol, Thioridazin, Chlorprothixen, Biperidin oder Diazepam.

Die Patienten sowie die Kontrollpersonen waren alle aus der Psychiatrischen Klinik des Zentralinstitutes für Seelische Gesundheit, Mannheim.

7.2.5. Sarkoidose-Patienten

Es wurden 25 Patienten untersucht, bei denen die Diagnose Sarkoidose gestellt worden war. Die Gruppe bestand aus 13 Frauen und 22 Männern im Alter von 22 bis 64 Jahren. Sie waren alle Patienten der Thoraxklinik, Heidelberg. Die Krankheitsbilder zeigten alle Stadien der Sarkoidose auf, die sich in der Granulomentwicklung äußern: Exsudation, frisches Granulom, fibrosierendes Granulom, fortgeschrittene Fibrose; die Patienten hatten verschiedene Therapiezyklen hinter sich.

Die Kontrollgruppe bestand aus 38 gesunden erwachsenen Individuen beiden Geschlechts im Alter von 20 bis 63 Jahren.

IV. METHODEN

1. Gewinnung von Humanblut

Es wurde mit heparinisierten (50 I.E./ml) Einmalspritzen venöses Blut aus der Armvene gewonnen. Für Trennungsverfahren wurden, um ausreichend Leukozyten zu erhalten, sogenannte Buffy coats von Blutspendern verwendet. "Buffy coats" wurden wie folgt gewonnen: Eine frische Blutkonserve wurde bei 4°C 20 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die verschiedenen Fraktionen in folgender Reihenfolge abpipettiert: 1. Plasma, 2. Mononukleäre Zellen und Granulozyten (Buffy coat). Übrig blieb das Erythrozytenpellet.

2. Gewinnung von Humanserum

Zur Gewinnung von Blutserum wurde zusätzlich venöses Vollblut mit nicht heparinisierten Einmalspritzen abgenommen. Durch Zentrifugation (10 Minuten) bei 1800 Upm wurde das Serum von zellulären Bestandteilen des Blutes abgetrennt. Die Serumproben wurden bei -20°C aufbewahrt.

3. Präparation menschlicher Lymphozyten

Zellsubpopulationen mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften können auf Grund verschiedener Größe und Dichte getrennt werden, da die Sedimentationsgeschwindigkeit von Suspensionszellen proportional dem Durchmesser und dem Unterschied zwischen der Dichte der Zellen und der des umgebenden Mediums ist (Böyum, 1974). Heparinisiertes Vollblut wurde mit HBSS oder mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1 verdünnt. Das so verdünnte

Vollblut wurde vorsichtig in einem 50 ml Falconröhrchen mit Hilfe einer Pipette über Lymphoprep^{R} (Metrizoat/Ficoll) im Verhältnis 1 Teil Lymphoprep^{R} und 2 Teile verdünntes Blut geschichtet. Eine Vermischung sollte dabei vermieden werden, da sich sonst die eingestellte Dichte von 1,077 $\pm$ 0,001 g/ml der Trennflüssigkeit ändert.

Die Röhrchen wurden in einer auf 20^{o}C vorgewärmten Zentrifuge bei langsam steigender Drehzahl 30 Minuten bei 400 xG = 1600 Upm zentrifugiert. Dabei werden die Blutzellen ihrer Dichte nach getrennt. Der in der Zwischenphase erscheinende helle Ring bei einer Dichte von 1,080 g/ml besteht zu 85-90% aus B- und T-Lymphozyten und zu 10-15% aus Monozyten, während Erythrozyten (Dichte 1,095-1,100 g/ml), Granulozyten, Zellbruchstücke und tote Zellen sich im Pellet befinden (siehe Abb. 1).

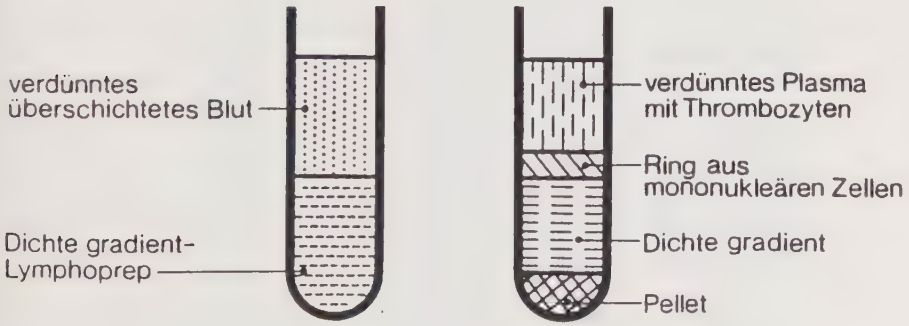


Abb. 1. Dichtegradient vor und nach der Zentrifugation

Der Ring in der Zwischenphase wurde vorsichtig abpipettiert und in HBSS/Heparin 50 I.E./ml aufgenommen und bei 800 Upm ca. 10 Minuten wieder zentrifugiert, um die Zahl der Thrombozyten zu verringern. Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit heparinfreiem HBSS wurden die Zellen in Medium RPMI 1640, welches 2 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5% FBS oder 2% humanes AB-Serum enthielt, resuspendiert und auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

4. Bestimmung der Lymphozytenzahl

Die Zählung der Lymphozyten erfolgte entweder mit Hilfe eines elektronischen Partikelzählers oder in der Neubauer Zählkammer (Abb. 2).

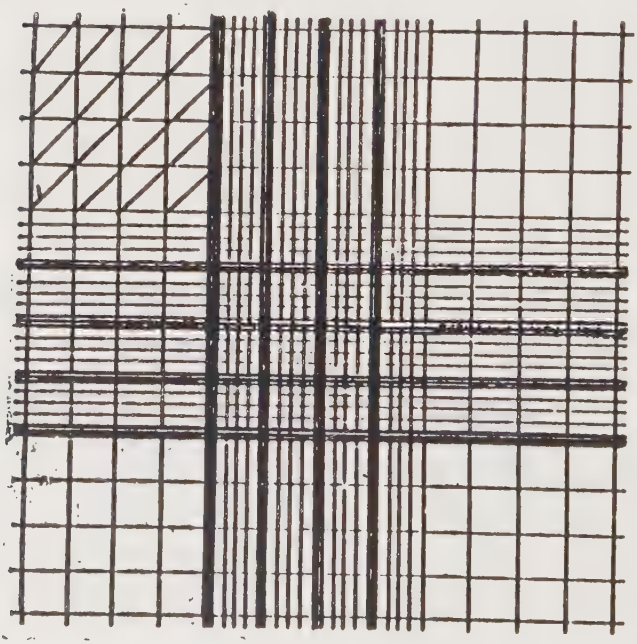


Abb. 2. Neubauer Zählkammer (Zellzahl/ml = Zellzahl aus 16 kleinen Quadraten x 10^4)

5. Vitalitätsprüfung mit Trypanblau

Trypanblau wird von lebenden Zellen aktiv ausgeschieden. Geschädigte oder tote Zellen sind nicht mehr in der Lage, den in die Zellen diffundierenden Farbstoff zu eliminieren und färben sich daher blau an.

Für die Vitalitätsprüfung wurden 0,1 ml einer Zellsuspension mit 0,9 ml Trypanblau 0,5% verdünnt. Die Zellen wurden anschließend in der Neubauer Zählkammer gezählt und der Prozentsatz toter Zellen wie folgt berechnet:

$$\% \text{ tote Zellen} = \frac{\text{Anzahl blau gefärbter Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

6. Vollbluttechnik

Heparinisiertes Vollblut (50 I.E./ml) wurde zwei bis drei Stunden nach Abnahme mit Medium RPMI 1640 (Gibco Europe, Karlsruhe) im Verhältnis 1:5 gemischt. Das Kulturmedium enthielt 2 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Es wurde kein weiteres Serum zugesetzt. Die verdünnten Blutproben wurden zu je 0,9 ml in Teströhrchen verteilt und jedem Versuchsansatz wurden verschiedene Stimulantien in einem Volumen von 0,1 ml zugesetzt. Dabei handelte es sich um unspezifische Mitogene wie Phytohemagglutinin aus Phaseolus vulgaris (PHA, 6,25 µg/ml), Concanavalin A (Con A, 6,25 µg/ml) und Pokeweed Mitogen (PWM, 10 µg/ml). Desweiteren wurden verschiedene Antigene verwendet wie das bakterielle Antigen Tuberculin (PPD, 10 µg/ml) und virale Antigene, Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) Stamm WAL (1×10^7 physikalische Partikel/ml) und die Zytomegalie Viren (CMV) Stamm AD169 und Stamm Davis (je 1×10^6 physikalische Partikel/ml). Die einzelnen Vollblutproben wurden gut gemischt und anschließend in speziellen Testverfahren die Lymphoproliferation und Interferonproduktion untersucht (Abb. 3).

- Vollblut - RPMI 1640
1:15

Zugabe von Stimulantien:

- virale Antigene: CMV AD 169
HSV-1 WAL
- Recallantigen: Tuberculin PPD
- Mitogene: Phytohemagglutinin (PHA)
Concanavalin A (Con A)
Pokeweed Mitogen (PWM)

3-fach-Ansätze zu je 200 µl/well

Inkubation 6 Tage, 37°C

1 µCi ^{3}H-Thymidin/well
Inkubation 4 Stunden, 37°C

Harvesten

Bestimmung der Radioaktivität
im Szintillationsspektrophotometer

Abb. 3. Schema der Vollbluttechnik

7. Lymphoproliferationstest

Die mit einem Stimulans versetzten Vollblutproben oder Lymphozytensuspensionen wurden in dreifachen Ansätzen zu je 0,2 ml auf einer 96-Loch Rundboden-Mikrotiterplatte (Nunc, Dänemark) verteilt und für 5 bis 7 Tage in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO_2 und 95% relative Luftfeuchtigkeit inkubiert. Diese Kulturen wurden dann mit je 1 µCi ^{3}H-Thymidin (Amersham Buchler, Braunschweig) radioaktiv markiert und 4 weitere Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Skatron-Harvester (Titertek, Flow Laboratories, Meckenheim) abgesaugt. Bei diesem Absaugvorgang wurden diejenigen Zellen, die ^{3}H-Thymidin in ihre DNS eingebaut hatten, auf einem Spezialfilterpapier zurückgehalten. Die Filter wurden getrocknet und einzeln in Plastikfläschchen mit zusätzlich 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint 11, Roth, Karlsruhe) gegeben. Nach ca. einstündigem Abkühlen bei 4°C wurde die auf die Filter präzipitierte nicht lösliche Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Mark II, Searle Analytics, Nuclear Chicago Div., Heusenstamm) bestimmt und in counts per minute (cpm) ausgedruckt.

Von jeder Kultur wurden Dreifachansätze untersucht, der Mittelwert der Radioaktivitäten gebildet und bei einem Teil der Versuche der Stimulationsindex (SI) berechnet.

$$SI = \frac{^3\text{H-Thymidin-Einbau stimulierter Kulturen (cpm)}}{^3\text{H-Thymidin-Einbau unstimulierter Kulturen (cpm)}}$$

8. Interferon-Testüberstände

Zur Bestimmung des Interferon-Gehalts in Testüberständen wurden die stimulierten Vollblutproben (s. IV.6.) oder Lymphozytensuspensionen ebenfalls zu je 0,2 ml als Doppelwerte auf 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatten gegeben

und für 1 bis 2 Tage bei 37°C, 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden die Mikrotiterplatten bis zur weiteren Austestung des IFN-Gehalts bei -20°C eingefroren.

9. Interferon-Test (IFN)

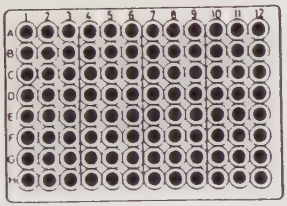
9.1. Durchführung

Die Bestimmung des IFN-Gehalts von Testflüssigkeiten wurde nach der CPE-Inhibitionsmethode durchgeführt. Diese Methode, bei der der zytopathische Effekt des Vesicular Stomatitis Virus inhibiert wird, ermöglicht im Vergleich zur Plaque-Reduktionsmethode eine einfachere Titerbestimmung und eine bessere Reproduzierbarkeit. Zur Durchführung des Interferon-Tests wurden je nach auszutestendem IFN-Überstand in Mikrotiter-Platten Zellrasen verschiedener Zellinien angelegt. Nachdem der Zellrasen konfluent war, wurden die aufgetauten Testüberstände (s. IV.8.) in Doppelwerten zu je 100 µl in je 6 Verdünnungsstufen einer 1:3 Verdünnungsreihe (1:3, 1:9, etc. bis 1:729) mit Hilfe einer 8-Kanalpipette (Multichannel-Finnpipette, Flow Laboratories, Meckenheim) aufgetragen. Überstände von Viruspräparationen wurden vor dem Test für 1 Stunde unter UV-Licht gestellt, um möglicherweise virulentes Material zu inaktivieren.

Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Interferonstandard, ein humanes rekombinantes Leukozyten-IFN (IFN-α, 10^6 I.E./ml, Hoffmann-LaRoche, Basel) verwendet. Eine I.E. des Referenz-Interferons entsprach einer Einheit in unserem Testsystem. Der Einfachheit wegen wurde der Interferonstandard mit RPMI 1640 + 10% FCS bis auf 80 I.E./ml verdünnt und bei -70°C gelagert.

Nach 18-24stündiger Inkubation bei 37°C wurde der Überstand von den Mikrotiterplatten dekantiert. Die Platten wurden an der Oberfläche mit einem sterilen Filterpapier abgetrocknet, um in der Folge keinen IFN-haltigen Überstand zu verschleppen. Anschließend wurden 200 µl/Loch einer Suspension aus:

Abb. 4. Schematische Darstellung des Interferon-Tests

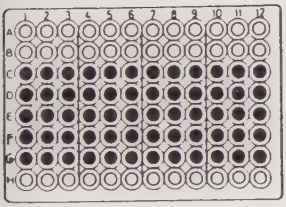


● = L-929-Zellen

Tag 0

Aussäen von L-929-Zellen (2×10^4/Loch) in Mikrotiter-Platten, um einen konfluenten Zellrasen zu züchten

24-stündige Inkubation bei 37°C



ZK

IFN-K

VK

o = Testproben

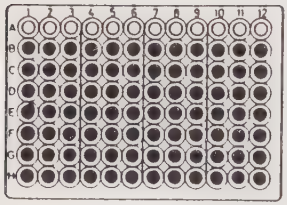
Tag 1

Auftragen der Testproben (50 µl in 3er-Verdünnungsstufen (1:3, 1:9, bis 1:729), einschließlich Kontrolle:

- Zellkontrolle (ZK)
- Bekannte Menge IFN (IFN-K)
- Viruskontrolle (VK)

18- bis 24-stündige Inkubation bei 37°C

ZK



Tag 2

IFN-K

Infektion des Zellrasens mit
100 µl VSV in BME (2×10^3)
PFU/Loch (=MOI 0.1)

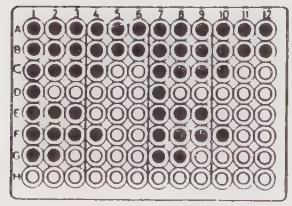
VK

● = VSV

2-stündige Adsorption bei 37°C
100 µl Medium (BME + 2% FBS)
+ 1% Gentamicin + 1% Glutamin)

48-stündige Inkubation bei 37°C

ZK



Tag 4

IFN-K

Fixieren der Zellen mit 4%iger
Formalinlösung und Färben mit
1%iger Kristallviolettlösung

VK

o = zerstörter Zellrasen

● = intakter Zellrasen

Bestimmung des Endpunktes

BME

FCS (2%)

Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml)

L-Glutamin (2 mM)

VSV (1×10^4 PFU/ml)

aufgetragen. Zusätzlich wurden zwei Kontrollen angelegt, eine Zellkontrolle und eine Viruskontrolle.

Nach weiterer Inkubation von 24-48 Stunden wurden die Überstände der Mikrotiterplatten abgegossen, die adhärenten Zellen für 5 Minuten mit einer 4%igen Formalinlösung fixiert und anschließend mit einer 1%igen Kristallviolettlösung gefärbt (Abb. 4).

9.2. Bestimmung des IFN-Titers

Eine internationale Einheit (IE) Interferon ist definiert als die Menge, die die Hälfte der Zellen einer definierten Zellkultur vor der Zerstörung durch ein Virus bewahrt. Bei der CPE-Inhibitionsmethode ist der Endpunkt der Titration und somit der IFN-Titer in der Verdünnungsstufe gegeben, in der der Zellrasen noch zu 50% vor einer Virusdosis geschützt ist, die normalerweise einen 100%igen CPE (völlige Zerstörung des Zellrasens, sichtbar in der Viruskontrolle) zur Folge hat (Abb. 5).

Die Aktivität an IFN entspricht dann dem reziproken Wert der Verdünnung am Endpunkt der Titration. Diese IFN-Aktivität wird in Einheiten (Units, U) angegeben. Durch Vergleich mit dem NIH Standard G002-904511 (National Institutes of Health, USA) erfolgt die Umrechnung in internationale Einheiten (IE).

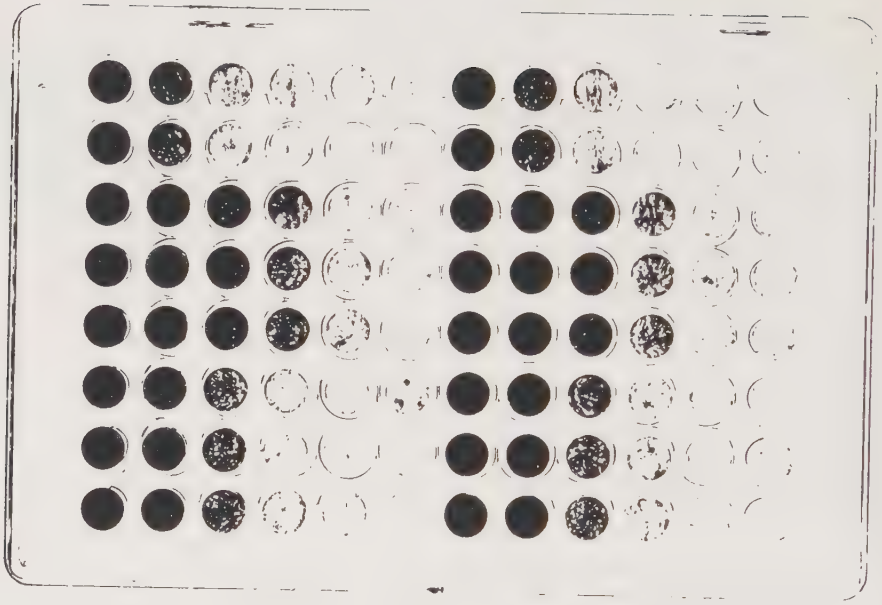


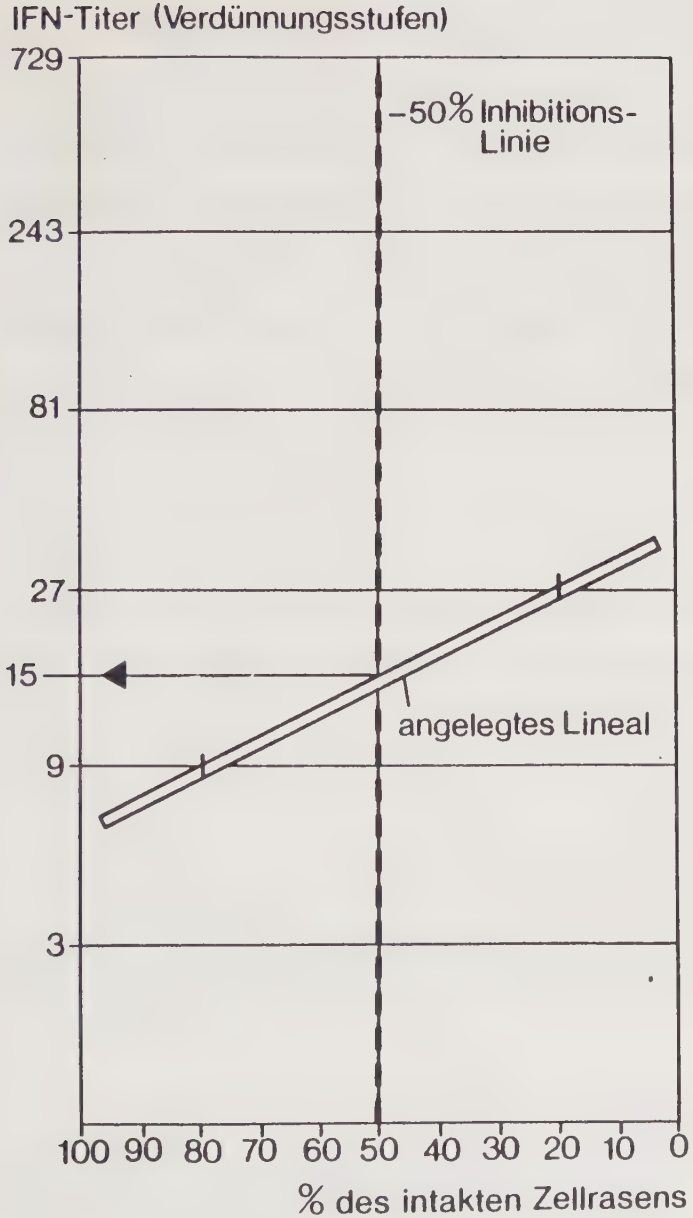
Abb. 5. Gefärbte Testplatte

Den IFN-Titer und damit auch die IFN-Aktivität entnimmt man aus einer Graphik, bei der die Ordinate die Titer und die Abszisse den Prozentsatz des zerstörten Zellrasens angibt. Graphisch bestimmt man 50% des intakten Zellrasens und erhält damit den IFN-Titer. An Hand eines Beispiels soll die Bestimmung des Titers einer Probe erläutert werden, der von der 50% Marke abweicht:

Verdünnungsstufe 1:9 = IFN-Titer 9 = 80% des Zellrasens intakt

Verdünnungsstufe 1:27 = IFN-Titer 27 = 20% des Zellrasens intakt

Der Schnittpunkt der Verbindungsgeraden mit der 50% Marke ergibt einen IFN Titer von 15 I.E. IFN (Abb. 6).


IFN-Titer (Verdünnungsstufen)
729
243
81
27
15
9
3
–50% Inhibitions-Linie
angelegtes Lineal
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
% des intakten Zellrasens

10. Gewebezellkulturen

10.1. WISH, HEp-2

WISH-Zellen sind menschliche Amnionzellen, HEp-2-Zellen stammen aus einem menschlichen epidermoiden Larynxkarzinom. Beide Zellinien wurden zur Durchführung des Interferon-Tests für menschliche Interferonüberstände verwendet.

Zur Züchtung der Zellen wurden Vierkantflaschen (Roux-Flaschen) aus Glas verwendet. Das Kulturmedium war für beide Zellinien BME, das 15% FCS enthielt. Nach etwa 6 Tagen hatten die Zellen einen konfluenten Rasen gebildet. Danach wurde das Kulturmedium dekantiert und der Zellrasen mit serumfreiem BME gewaschen, um das im Kulturmedium enthaltene FCS zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung 1 bis 2 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Zellen von der Glaswand zu lösen. Die so erhaltene Zellsuspension konnte dann etwa mit der 5-fachen Menge Kulturmedium verdünnt und auf neue Vierkantflaschen verteilt werden. Unverbrauchtes Trypsin wurde dabei durch das im Kulturmedium enthaltene FCS inaktiviert. Für die im Interferontest verwendeten Kulturplatten (96-Loch-Mikrotiterplatten) wurden Suspensionen frisch trypsinierter Zellen mit Kulturmedium hergestellt und auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen pro ml Kulturmedium eingestellt. Mit Hilfe einer Multichannel-Finnpipette wurden dann 100 µl der Zellsuspension (= 4×10^4 Zellen) pro Loch ausgesät. In der Regel bildeten die Zellen bei 37°C nach 24-48 Stunden einen konfluenten Zellrasen, der unter dem Mikroskop kontrolliert wurde.

10.2. HEL

HEL-Zellen (Humane Embryonale Lungenzellen) sind Fibroblasten, die durch Anzüchtung und Klonierung von embryonalem Lungengewebe gewonnen

wurden. In ihnen wurde das humane Zytomegalie Virus (HCMV) gezüchtet. Die Kultivierung der HEL-Zellen erfolgte ebenfalls in Vierkantflaschen (Roux-Flaschen) aus Glas. Die Bildung eines konfluenten Zellrasens betrug 4 bis 5 Tage. Danach wurden die Flaschen im Verhältnis 1:4 umgesetzt, d.h. die Zellen wurden passagiert. Dabei wurde das Kulturmedium, das aus BME + 10% nicht inaktiviertem FCS bestand, dekantiert und der Zellrasen mit sterilem PBS abgespült, um restliches FCS zu entfernen. Dann wurden die Zellen durch 7-10minütige Inkubation bei 37°C mit 0,05%iger Trypsin-EDTA-Lösung von der Glaswand entfernt, in BME + 10% nicht inaktiviertes FCS aufgenommen, auf 4 neue Roux-Flaschen verteilt und im Brutschrank bei 37°C bis zur erneuten Ausbildung eines konfluenten Zellrasens inkubiert.

10.3. RITA

RITA-Zellen stammen aus Affennieren der afrikanischen grünen Meerkatze und wurden zur Züchtung von Herpes Simplex Virus (HSV) verwendet. Das Kulturmedium war MEM, welches 7% inaktiviertes FCS enthielt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie 10.2.

10.4. CV-1

CV-1 Zellen sind ebenfalls Affennieren-Zellen der afrikanischen grünen Meerkatze und dienten zur Vermehrung von Vesicular Stomatitis Virus (VSV). Das Kulturmedium war hier BME + 10% FCS. Die Kultivierung der Zellen erfolgte ebenfalls wie bei 10.2. beschrieben.

11. Virus

11.1. Verwendete Virusstämme

11.1.1. Humanes Zytomegalie-Virus (HCMV), Stamm AD169 und Stamm Davis

Diese beiden Stämme sind die international am besten charakterisierten HCMV Stämme.

Die Virusvermehrung erfolgte in HEL-Zellen. Dabei wurden HEL-Zellen in Rouxflaschen in BME + 10% FCS zu konfluentem Zellrasen gezüchtet (s. 10.2.). Zur Infektion wurde das Medium dekantiert, die Zellen dreimal mit Hank'scher Lösung gewaschen und mit transfiziertem, plaque-gereinigtem und somit mykoplasmenfreiem HCMV Stamm AD169 oder Stamm Davis bei niedriger MOI (= 0,01) infiziert, um die Bildung defekter interferierender Partikel zu vermeiden (von Magnus, 1954; DeMarchi und Kaplan, 1977). Nach zweistündiger Adsorption bei 37°C wurden die Zellen zweimal mit Hank'scher Lösung gewaschen und anschließend in BME + 10% inaktiviertem FCS bei 37°C im Brutschrank (5% CO_2) inkubiert. Nach 7-10 Tagen (75-80% CPE) wurden die Flaschen durch dreimaliges Frieren und Tauen aufgeschlossen, um nicht nur extrazelluläres Virus, sondern auch intrazelluläres Virus zu ernten. Zelltrümmer und Zellkerne wurden bei 3000 Upm, 4°C für 15 min abzentrifugiert, der virushaltige Überstand aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt. Der Virustiter von HCMV AD169 und Davis betrug jeweils 1 x 10^6 PFU/ml.

11.1.2. Herpes Simplex Virus Typ 1, Stamm WALCH (HSV-1 WAL)

HSV-1 Stamm WAL wurde von Prof. Dr. Munk aus menschlichen Hautefloreszenzen im labialen Bereich gewonnen (Munk und Donner, 1973). Danach folgten etwa 35 Passagen in Mäusegehirnen (Stamm STU). Die infizierten Gehirne wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, gefroren, getaut, zentrifugiert und der virushaltige Überstand sterilfiltriert. Dann wurde das Virusmaterial

zweimal hintereinander in menschlichen Lungenzellen (HEL) passagiert und auf der Affennieren-Zellinie RITA kloniert. Anschließend wurde das Virus aus Plaques isoliert und bei einer MOI von 0,02 auf RITA-Zellen vermehrt. 24 Stunden später konnten die Viruspartikel aus dem Überstand von RITA-Zellen durch Zentrifugation (27 000 xG, 1 Stunde) gewonnen werden. Mit Hilfe einer Transfektionstechnik wurde die Extraktion von infektiöser, viraler DNA und nachfolgender Infektion von BSC-1-Zellen (einer Affennierenzellinie) durchgeführt. 3 Tage nach Infektion der BSC-1-Zellen traten HSV-1 Plaques auf. Das Virus wurde dann wiederum in RITA-Zellen bei einer MOI von 0,02 vermehrt, um einen neuen Virusstamm zu erhalten. Die von der vorangegangenen abgeleiteten ersten Passage bei hoher MOI (1,5) wurde als HSV-1 WAL verwendet. Die genaue Methodik der Vermehrung des Virus ist derjenigen von HCMV (s. 11.1.1.) vergleichbar. Die Infektiosität in Zellkulturen betrug 1×10^7 PFU/ml.

11.1.3. Vesicular Stomatitis Virus, Stamm Indiana (VSV)

VSV diente als Indikatorvirus beim Interferon-Test. Das Virus ist unter den gewählten Bedingungen selbst nicht in der Lage, IFN zu induzieren und ermöglicht somit die korrekte Bestimmung der IFN-Aktivität. Die Vermehrung erfolgte in CV-1-Zellen, einer von Affenieren abstammenden Zellinie. Der Titer lag bei 1×10^8 PFU/ml.

Alle Viruspräparationen waren mykoplasmenfrei. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie in Aliquots bei -70^oC aufbewahrt.

11.2. Mykoplasmennachweis

Alle verwendeten Virussuspensionen und Zellkulturen wurden auf eventuelle Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Dies war notwendig, da Mykoplasmenkontaminationen von Zellkulturen zu falschen Versuchsresultaten führen können.

Weiterhin wird die Virusvermehrung in der Zelle durch Mykoplasmen behindert. Der Nachweis mykoplasmatischer Kontamination wurde an Hand zweier Methoden durchgeführt.

11.2.1. Mykoplasmennachweis durch Kultivierungsmethode

Die zu untersuchenden Proben wurden auf einen speziellen Mykoplasmen-Agar aufgetragen und 6 Tage unter Stickstoffbegasung bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Kultivierbare Mykoplasmen wuchsen in dieser Zeit zu mikroskopisch gut sichtbaren Kolonien mit Spiegeleikonformation aus.

11.2.2. Mykoplasmennachweis durch DNS-Analyse in der Dichtegradienten-Zentrifugation

Frisch ausgesäte Zellkulturen wurden mit 5 µCi/ml ^{3}H-Thymidin für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte eine DNS-Extraktion und Ultrazentrifugation im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten bei 35 000 Upm für 48 Stunden bei 20°C. Da die Mykoplasmen-DNS eine andere Dichte (ϱ = 1,685) besitzt als die zelluläre DNS (ϱ = 1,700) ergibt sich im Gradienten eine gute Trennung. Waren Kulturen mit Mykoplasmen verunreinigt, so zeigte sich im Gradientenprofil ein zweiter Aktivitätsgipfel.

Auf die gleiche Weise ließen sich Mykoplasmenkontaminationen von Virussuspensionen nachweisen. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode war, daß sich die Dichte der Virus-DNS von der der Mykoplasmen-DNS genügend unterschied.

11.3. Herstellung mykoplasmenfreier HCMV-Virusstämme mittels Transfektion und Virusklonierung

11.3.1. Isolierung viraler DNS aus infizierten HEL-Zellen

Konfluente HEL-Zellen wurden mit HCMV Stamm AD169 oder Davis mit einer MOI von 5 infiziert. Nach zwei Stunden Adsorption bei 37°C wurde das Adsorptionsvolumen (= 10 ml) dekantiert und die Kulturen mit BME + 10% FCS bei 37°C im Brutschrank inkubiert. 12 Stunden nach der Infektion wurde neu synthetisierte virale DNS durch die Zugabe von 5 µCi/ml ^{3}H-Thymidin radioaktiv markiert. Bei ca. 70% CPE wurden die infizierten Zellen mit TNE-Puffer unter Zugabe von 1% Sarcosyl lysiert und das Lysat über Nacht bei 37°C mit 200 µg/ml Proteinase K inkubiert.

11.3.2. Reinigung der viralen DNS

Nach der Inkubation mit Proteinase K wurde die Probe zweimal mit Phenol, dann einmal mit einer Mischung (1:1) von Phenol mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und schließlich einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die Gesamtmenge an DNS wurde photometrisch gemessen. Die DNS-haltige Lösung wurde mit festem Cäsiumchlorid auf eine Dichte von 1,716 g/cm^{3} eingestellt und in einem 50 Ti Festwinkelrotor für 72 Stunden bei 35.000 Upm, 20°C zentrifugiert. Dabei wurden pro Gradient ca. 150 µg DNS aufgetrennt. Der Gradient wurde nach dem Lauf durch ein Loch am Boden des Zentrifugenröhrchens fraktioniert. Aliquots von 10 µl wurden auf Whatman 3MM Filter getüpfelt, diese getrocknet, 10 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und im Szintillationsspektrophotometer gemessen. Zusätzlich wurde die Dichte jeder Fraktion bestimmt. Es ergab sich ein Gradientenprofil mit drei Aktivitätsgipfeln, entsprechend der Virus-DNS, Zell-DNS und Mykoplasmen-DNS. Die Fraktionen der viralen DNS (erster Aktivitätsgipfel) wurden vereinigt und einer zweiten Cäsiumchlorid-

Gleichgewichtszentrifugation unter gleichen Bedingungen unterworfen. Die dadurch erhaltene HCMV-DNS wurde zur Transfektion eingesetzt.

11.3.3. Transfektion

Die Transfektion wurde in der von Graham et al. (1973) und von Miller et al. (1979) modifizierten $CaCl_2$-Technik durchgeführt. 1 /ug HCMV-DNS wurde mit 10 /ug/ml Kalbsthymus-DNS in HEPES-Puffer gelöst. $CaCl_2$ wurde in einer Endkonzentration von 125 mM zugesetzt und die Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Aliquots von jeweils 1 ml wurden mit 2×10^6 frisch trypsinierten HEL-Zellen gemischt und für 45 min im Schüttelwasserbad bei 37^oC inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden mit $4,5 \times 10^6$ trypsinierten HEL-Zellen gemischt und gleichmäßig auf Petrischalen (Ø 60 mm) verteilt. Nach ungefähr 8 Tagen konnten Plaques zur Virusklonierung abgeimpft werden.

11.3.4. Virusklonierung

Bei erfolgreicher Transfektion erscheinen auf dem Zellrasen der Indikatorzellen deutlich sichtbare Plaques, die den CPE durch neu synthetisiertes Virus darstellen. Mit einer sterilen Pipette wurde aus einem einzelnen Plaque die virushaltige Flüssigkeit entnommen und auf eine neue Wirtszellkultur übertragen. Da bei einer Transfektion die Möglichkeit besteht, daß mehrere Virusgenome von einer Wirtszelle als Replikationsmuster benutzt werden, wurde die Plaqueklonierung zweimal wiederholt. Nach Mykoplasmentestung wurde das gereinigte Virus vermehrt.

11.4. Virusreinigung von HCMV

Zur Aufreinigung von HCMV wurden konfluente HEL-Zellen mit HCMV bei einer MOI von 1 infiziert. Bei 100% CPE (8-9 Tage nach der Infektion) wurde

der Überstand geerntet und die im Überstand enthaltenen Zelltrümmer bei 3000 Upm, 4°C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann im SW27 Rotor bei 20.000 Upm für 120 min bei 4°C zentrifugiert, das Pellet in 2 ml TBS aufgenommen, und auf einen diskontinuierlichen,präformierten Saccharosegradienten (70-30% (w/v) Saccharose in TBS, jeweils 2 ml) geschichtet. Die Gradienten wurden im SW40 Rotor bei 27.000 Upm, 4°C für 90 min zentrifugiert. Die virushaltige Bande, zwischen 50%-60% Saccharose, wurde durch seitliches Anstechen des Röhrchens abgezogen, mit TBS verdünnt und das Virus im SW40 Rotor bei 30.000 Upm, 4°C, 120 min abzentrifugiert. Das virushaltige Pellet wurde in 1 ml TE-Puffer aufgenommen, weiter verdünnt und in Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

11.5. Charakterisierung von HCMV

11.5.1. Elektronenmikroskopische Darstellung der Virionen

Virionen wurden durch Negativkontrastierung dargestellt: 10-20 µl Virussuspension wurden auf kohlebeschichtete und kurz vorher beglühte Netze aufgetropft. Nach einer Einwirkungszeit von 60 sec wurde die Flüssigkeit bis auf einen Restfilm mit einem Filterpapier abgesaugt und mit wässrigen Tropfen von 20 µl Uranyl-acetat zur Kontrastierung auf das Netz pipettiert. Nach 1 min wurde die Färbelösung vollständig abgesaugt und das Präparat in trockenem Zustand bei Raumtemperatur aufbewahrt.

11.5.2. Virusstammcharakterisierung durch DNS-Analyse

11.5.2.1. Dichtebestimmung mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation

Gereinigte Virionen wurden in TNE 1% Sarcosyl lysiert und, wie beschrieben, mit Proteinase K verdaut und proteinextrahiert. Die DNS wurde durch Zugabe

von 0,1 Vol 3 M Na-Acetat, pH 5, 2,5 Vol Ethanol und Inkubation bei -20°C für mindestens 5 Stunden präzipitiert. Die DNS wurde für 20 min bei 12.000 Upm abzentrifugiert, einmal in Ethanol/TE (70:30 Vol.) unter den gleichen Bedingungen gewaschen und in Wasser aufgenommen. Zur Dichtebestimmung wurde die Nukleinsäure dann einer Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation unter den bei 11.3.2. beschriebenen Bedingungen unterworfen.

11.5.2.2. Identifizierung des Virusstammes

Zur Identifizierung wurde das Restriktionsenzym Hind III eingesetzt. Die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease Hind III ist 5'-AAGCTT-3'. Die Nukleinsäure von HCMV wurde wie in 11.7.2.1. präpariert. Nach der Proteinextraktion und Alkoholpräzipitation wurde die DNS in Wasser aufgenommen. Unter den folgenden Bedingungen wurden jeweils bis zu 50 µg Nukleinsäure verdaut:

20 U Hind III

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

10 mM $MgCl_2$

50 mM NaCl

Inkubation bei 37°C für 10 Stunden

Am Ende der Inkubationszeit wurden 2 µl Farbmarker (50% Saccharose, 1 mg/ml Xylencyanol, 1 mg/ml Bromphenolblau und 1 mg/ml Orange g) zugegeben und die Probe auf 0,5%, 1% und 2% Agarosegele aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen dienten SV40-DNS, PhiX-RF-DNS (Hae III-Fragment) und Lambda-DNS als Standardsubstanz. Der Elektrophoresepuffer setzte sich aus 40 mM Trisacetat/2 mM EDTA zusammen. Alle Gele wurden nach dem Lauf mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml, 45 min) gefärbt und unter UV-Licht photographiert.

11.6. Bestimmung des infektiösen Virustiters durch Plaque-Test

Unter einem Plaque versteht man eine gut von der Umgebung abgesetzte, veränderte Zone in einer konfluenten Zellkultur, die durch die lokale Vermehrung des Virus hervorgerufen wird. Man unterscheidet zwischen lytischen, degenerativen und proliferativen Plaques:

lytische Plaques - herdförmige Zonen lysierter Zellen

degenerative Plaques - Herd morphologisch veränderter Zellen

proliferative Plaques - Auftreten von Zellproliferation am Ort der Virusvermehrung

11.6.1. Plaque-Test für HCMV

Dazu wurden HEL-Zellen in 24-Loch-Platten (Linbro, Flow Laboratories, Meckenheim) bis zur Konfluenz gezogen. Dann wurde das Medium dekantiert und pro Loch 100 µl der zu testenden Virussuspension in einer Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-8} aufgetragen. Nach 2 Stunden Adsorption bei 7°C wurden die infizierten Zellen mit BME, 5% FCS, 2,5% Agarose überschichtet (1 ml Medium/Loch). Nach einer Woche wurde nochmals die gleiche Menge Medium zugefügt. Nach drei Wochen wurden die Plaques der ungefärbten Platten gezählt.

11.6.2. Plaque-Test für HSV-1

Zur Ermittlung des HSV-Titers wurden RITA-Zellen verwendet, die innerhalb von zwei Tagen in 24-Loch-Platten einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten. Nachdem das Kulturmedium vom Zellrasen dekantiert worden war, wurde in jedes Loch 0,2 ml einer stufenweisen Verdünnung (10^{-1} bis 10^{-8}) der zu testenden Probenflüssigkeit gegeben. Die Verdünnung erfolgte mit BME. Jede Verdünnung wurde doppelt aufgetragen. Nach einer Adsorptionszeit von etwa 2 Stunden bei 37°C wurde pro Loch 1,5 ml Carboxymethyl-Zellulose-Lösung (CMC) hinzuge-

fügt. Nach einer weiteren, 3-tägigen Inkubation bei 37°C traten im Zellrasen mikroskopisch gut erkennbare Plaques auf. Daraufhin wurde das CMC-Medium dekantiert, die Zellen mit Formalinlösung (4%) fixiert, gespült und mit Kristallviolettlösung (1%) gefärbt.

11.6.3. Plaque-Test für VSV

Die Titerbestimmung von VSV wurde analog der HSV-Titerbestimmung durchgeführt. Die verwendete Zellinie war hier die Affennierenzelle CV-1. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte durch Auszählen der Plaques in den zählbaren Endverdünnungsstufen der zu testenden Virussuspension und wurde als plaquebildende Einheit (PFU/ml) angegeben (Abb. 7).

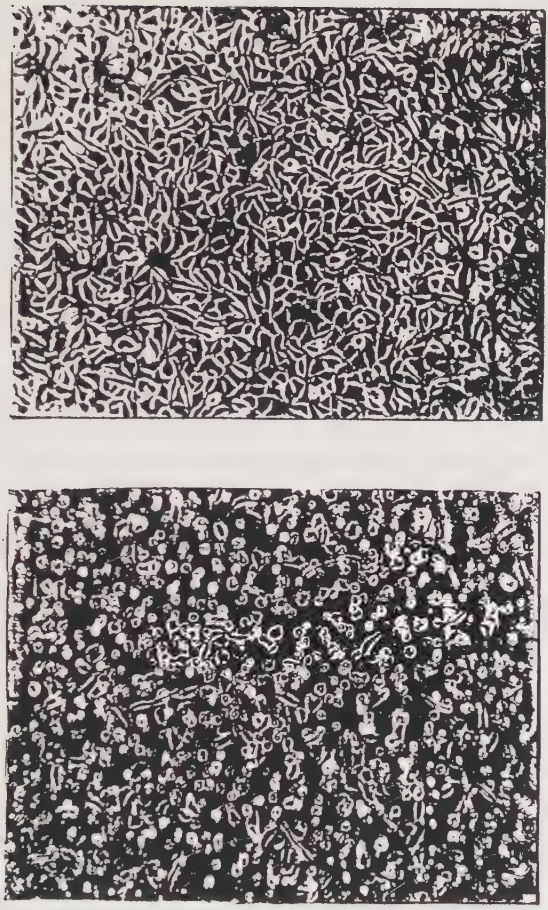


Abb. 7. Mikroskopische Aufnahme von uninfizierten L-929-Zellen (oben) und L-929-Zellen mit CPE nach VSV-Infektion.

11.7. Methoden zur Virusinaktivierung

Um die antigene Wirkung eines Virusstammes untersuchen zu können, ohne gleichzeitig eine produktive Infektion der Wirtszelle zu verursachen, wird das Virus inaktiviert. Dazu wurden verschiedene Methoden angewendet.

Hitzebehandlung: Die Virussuspension wurde eine Stunde bei 56°C im Wasserbad inaktiviert.

UV-Behandlung: Die Virussuspension wurde in einer Petrischale (Ø 60 mm) 90 min einer Strahlendosis von 80 erg/$\frac{mm^2}{sec}$ ausgesetzt.

Etherbehandlung: Die Virussuspension wurde mit der gleichen Menge Ether 5 min im Scheidetrichter geschüttelt. Nach Abtrennung der Etherphase durch Zentrifugation wurde in die wässrige Phase Stickstoff eingeleitet, um den überschüssigen Ether zu entfernen.

12. Bestimmung von Serum-Antikörpern gegen HCMV und HSV-1 mit Hilfe der ELISA-Technik

Die ELISA-Technik (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) ist ein hochempfindlicher Test sowohl zum quantitativen als auch zum qualitativen Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern im Serum. Der in der Serumprobe gesuchte Antikörper verbindet sich mit einem Antigen, das an die Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte beschichtet wurde. Nach einer betimmten Reaktionszeit wird das Enzym-Konjugat, ein Enzym-gekoppelter Antikörper (spezifisch für die nachzuweisende Substanz Anti-Human-IgG bzw. IgM) zugegeben, wieder eine definierte Zeit inkubiert und anschließend ein enzymspezifisches Substrat zugegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von z.B. Schwefelsäure (z.B. bei Peroxidase markier-

ten Antikörpern) gestoppt. Nicht gebundene Reaktanten werden durch Waschprozesse entfernt. Anschließend wird der durch die enzymatische Spaltung entstandene gelbgrüne Farbstoff im Photometer abgelesen.

Der Nachweis von humanem IgG und IgM in Seren verläuft analog, im folgenden wird der ELISA-Test für IgM aufgezeigt.

Zuerst wurden ELISA-Platten (Linbro, Flow Laboratories, Meckenheim) beschichtet, d.h., pro Loch der Mikrotiterplatten wurden 200 µl Ziege-Anti-Human IgM (GaHuIgM, Medac, Hamburg) gegeben und entweder 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten 3x in PBS gewaschen und mit 1% PBS-BSA über Nacht bei 4°C abgedeckt, wieder 3x in PBS gewaschen, getrocknet, in Plastik eingeschweißt und bei 4°C gelagert. Das GaHuIgM wurde in der Konzentration von 1 mg/ml in Carbonatpuffer (pH 9,6) verwendet. Die Protein-Konzentration betrug 1 µg/ml.

Für den eigentlichen Test wurden Kulturüberstände bzw. Standard-Humanserum (Behring, Marburg) in einer bestimmten Verdünnung auf die Platten aufgetragen (1:10 oder 1:20, in 1% PBS-BSA). In die erste Reihe der 1. Platte wurde keine Probe, sondern nur 1% PBS-PSA pipettiert ("Blank"). Dann wurden die Platten entweder 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Platten mit 200 µl Peroxidase-markiertem Ga HuIgM (1:2000 in PBS-BSA; Medac, Hamburg) gefüllt und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden wieder 2x gewaschen, dann wurde 200 µl Substrat (Ortho-Phenylendiamin, OPD, Sigma, München) zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur im dunkeln wurde die Reaktion mit 50 µl 3 M H_2SO_4, 40 ml konz. H_2SO_4 und 460 ml Aqua dest. gestoppt. Die Extinktion wurde im Photometer (Titertek, Flow Laboratories, Meckenheim) bei OD 492 nm gemessen.

13. Statistik

Zum Vergleich zweier Stichprobenpaare aus Grundgesamtheiten, deren Verteilungsform unbekannt ist, wird das von Wilcoxon entwickelte Prüfverfahren eingesetzt. Der Wilcoxon-Test gehört mit einer Effizienz von 95% zu den schärfsten parameterfreien Verfahren. Dabei lautet die Nullhypothese (Ho): Die Variable hat unter zwei Bedingungen die gleiche Verteilung. Bei der Alternativhypothese (H1) unterscheiden sich die Variablen in der "zentralen" Tendenz, d.h., die Variable ist unter einer Bedingung größer als unter der anderen.

Zur Berechnung der Prüfgröße T geht man von Rangplätzen aus. Zunächst werden die Differenzen d_i berechnet. Diese Differenzen werden nach ihren Absolutbeträgen in eine Rangfolge gebracht. Die Summe für die Rangplätze $d_i < 0$ ist T; die Summe für die Rangplätze $d_i > 0$ ist T'.

$$T + T' = \frac{n\,(n+1)}{2}$$

n = Anzahl der Stichproben

Der Erwartungswert der Prüfgröße T für den Fall der gleichen Verteilung unter beiden Bedingungen (Ho) ist gleich der halben Summe aller Rangplätze:

$$E\,(T) = \frac{n\,(n+1)}{4}$$

Zu der von Wilcoxon berechneten Verteilung der Prüfgröße T lassen sich zu gegebenen Irrtumswahrscheinlichkeiten und Stichprobenumfänge kritische Werte $T_{\alpha,n}$ ermitteln. α kann sein 0,10; 0,05; 0,02; 0,01. Bei $T > T_{\alpha,n}$: Annahme der Nullhypothese. Bei $T \leq T_{\alpha,n}$: Zurückweisung der Nullhypothese (Hollander und Wolfe, 1973).

V. ERGEBNISSE

1. Vorarbeiten

1.1. Gewinnung mykoplasmenfreier HCMV Stämme durch Transfektion

Die HCMV Stämme AD169 und Davis waren nach Erhalt von anderen Laboratorien mit Mykoplasmen kontaminiert. Um mykoplasmenfreies Virus zu erhalten, wurden konfluente HEL-Zellen mit HCMV Stamm AD169 bzw. Davis infiziert, die neu synthetisierte DNS mit ^{3}H-Thymidin markiert und die Zellen bei ca. 70% CPE lysiert. Die Proben wurden proteinextrahiert und die erhaltene DNS im Cäsiumchlorid-Gradienten aufgetrennt. Es ergab sich ein Gradientenprofil mit drei Aktivitätsgipfeln, die der Virus-DNS, der Zell-DNS und der Mykoplasmen-DNS entsprechen. Die aus diesen Gradienten isolierte Virus-DNS (Fraktionen im ersten Aktivitätsgipfel) wurden unter den gleichen Bedingungen einer zweiten Cäsiumchlorid-Gradienten-Zentrifugation unterworfen. Im Profil dieser Gradienten konnte nur noch ein Aktivitätsgipfel nachgewiesen werden. Bei einer Dichte von 1.716 g/cm^{3} war die Bande der viralen DNS (vgl. Huang et al., 1973).

Die durch diese Reinigung erhaltene DNS wurde zur Transfektion eingesetzt. 1 µg der viralen DNS wurde nach der Methode von Miller et al. (1979) auf HEL-Zellen übertragen. Einzelne Virusplaques wurden geerntet und neue Zellkulturen beimpft. Die Plaqueklonierung wurde zweimal wiederholt. Der in diesen Kulturen beobachtete zytopathische Effekt ist in Abb. 8 dargestellt. Zum Vergleich zeigt Abb. 9 uninfizierte HEL-Zellen. Dreifach Plaque kloniertes Virus wurde gezüchtet und auf Verunreinigung durch Mykoplasmen getestet. Weder durch Kultivierungsmethoden noch durch DNS-Analysen im Cäsiumchlorid-Gradienten waren Mykoplasmen nachweisbar.

Abb. 8. Zytopathischer Effekt von HCMV Stamm AD169 auf HEL-Zellen. Vergrößerung 1:62.

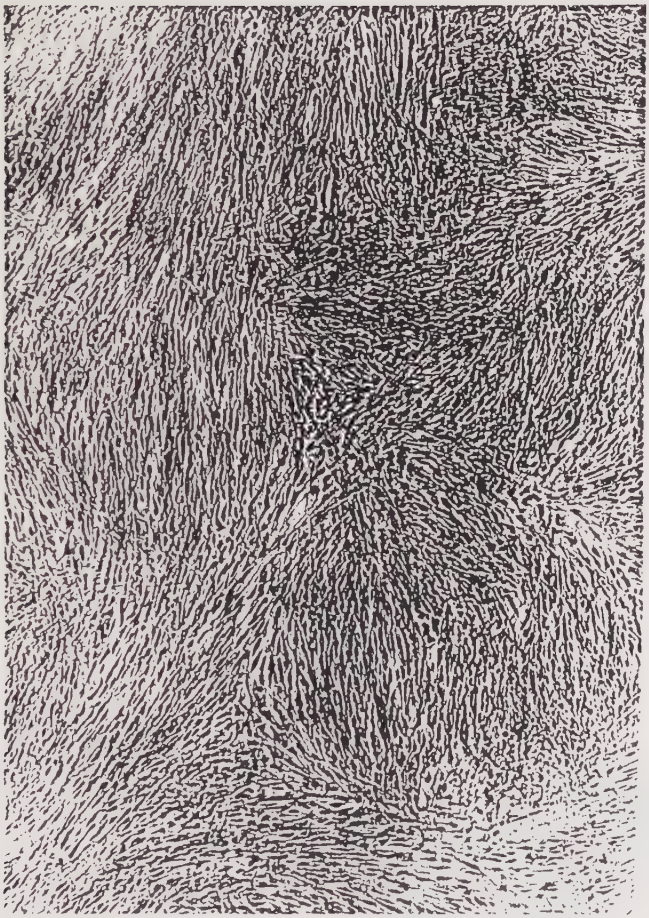


Abb. 9. HEL Zellen. Vergrößerung 1:65

1.2. Viruscharakterisierung

Zur Viruscharakterisierung wurden HEL-Zellen mit HCMV Stamm AD169 bzw. Davis bei einer M.O.I. von 1 infiziert, Überstandsvirus präpariert und im Saccharosegradienten gereinigt. Die Bande der intakten Virionen befanden sich zwischen 50 und 60% Saccharose. Zur elektronenmikroskopischen Analyse wurden die Virionen durch die Negativkontrastierung dargestellt. In allen Präparaten wurden typische Herpes-Partikel gefunden (Abb. 10).

Die Analyse der DNS aus gereinigten Virionen ergab die für HCMV Stämme charakteristische Dichte von 1.716 g/cm^3. Zur exakten Stammidentifizierung wurde das Restriktionsenzym Hind III eingesetzt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen stimmte mit den in der Literatur für den Stamm HCMV AD169 (Spector et al., 1982) und HCMV Davis (Kilpatrick et al., 1976) beschriebenen Schnittmustern überein.

Abb. 10. Elektronenmikroskopische Darstellung von HCMV Stamm Davis mittels Negativkontrastierung.
Vergrößerung: 1:69300 (oben); 1:102 000 (unten)

2. Lymphoproliferation und Interferoninduktion in humanen Lymphozyten

2.1. Einfluß der Lymphozyten-Zelldichte auf die Lymphoproliferation

Um die optimale Zelldichte für die Lymphoproliferation zu ermitteln, wurden Lymphozyten aus Buffy coats isoliert, mit Medium RPMI 1640 verdünnt und den Zellsuspensionen 10% FCS zugesetzt. Diese Zellsuspensionen wurden mit den Mitogenen PHA und Con A, jeweils 6,25 µg/ml, stimuliert und in verschiedenen Zelldichten auf 96-Loch Mikrotiterplatten verteilt und für 5 Tage inkubiert. Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, erwies sich eine Lymphozytenkonzentration von 1×10^6 Zellen pro ml am besten geeignet. Bei höherer Zelldichte war für PHA kein weiterer Proliferationsanstieg festzustellen, für Con A zeigte sich sogar eine geringere Proliferationsrate. Auch fiel bei der höheren Zelldichte der hohe Kontrollwert auf. In den nachfolgenden Experimenten wurde daher die Lymphozytenzelldichte routinemäßig auf 1×10^6 Zellen pro ml festgelegt.

Tabelle 1. Lymphozytenstimulation (cpm x 10^3) durch PHA und Con A bei verschiedener Zelldichte

Zellzahl/ml	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml
2×10^6	4,5	24,3	17,0
1×10^6	1,6	25,0	33,1
$0{,}5 \times 10^6$	1,7	1,1	3,8
$0{,}25 \times 10^6$	0,3	0,6	0,4

2.2. Einfluß der Konzentration von FCS auf die Lymphoproliferation und Interferonproduktion

Es wurde untersucht, ob die Konzentration an FCS im Medium die Lymphozytenstimulation beeinflußt. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, war die Lymphoproliferation in serumfreiem Medium sehr gering. Sie ließ sich durch Erhöhung der Serumkonzentration entscheidend steigern, allerdings tritt bei hoher Serumkonzentration auch ein hoher Kontrollwert auf. Da zwischen 5% und 10% FCS kein Unterschied festzustellen war, wurde routinemäßig 5% FCS dem Medium zugesetzt. Für die Interferonproduktion erwiesen sich in Parallelversuchen Serumkonzentrationen von 2% bis 5% FCS im Medium optimal.

Tabelle 2. Lymphozytenstimulation (cpm x 10^3) im Vergleich zwischen serumfreiem (sfr.) und FCS-haltigem Medium

Serumkonzentration	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml
serumfrei	0,4	1,1	0,3
5%	2,7	71,9	65,5
10%	2,5	75,0	58,5
20%	4,9	81,1	70,9

2.3. Einfluß von autologem und gepooltem humanem AB-Serum auf die Lymphoproliferation und Interferoninduktion

Mit einer Nachbestellung von FCS änderte sich die Charge des bis dahin verwendeten Serums. Bei Versuchen mit dem FCS der neuen Charge stellte sich allerdings heraus, daß sich bei Verwendung der bisher üblichen FCS-Konzentration

die Kontrollwerte entscheidend erhöhten, sodaß die Notwendigkeit gegeben war, erneut verschiedene Serumkonzentrationen auszutesten. Dabei ergaben sich auch bei nur 2,5% FCS noch sehr hohe Kontrollwerte. Versuche wurden unternommen, anstatt FCS autologes oder gepooltes menschliches AB-Serum dem Medium zuzusetzen. Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, daß mit gepooltem menschlichem AB-Serum die Lymphozytenstimulation nicht gehemmt wird. Es ergibt sich bei 2% AB-Serum-Zusatz eine Optimierung des Kontrollwerts sowie der Mitogenstimulationswerte, mit autologem Serum wurden ähnliche Werte erzielt. Dies gilt in gleichem Maße auch für die Interferoninduktion. In den folgenden Versuchen wurde dem Medium 2% AB-Serum zugesetzt.

Tabelle 3. Lymphozytenstimulation (cpm x 10^3) im Vergleich zwischen Medium mit Zusatz von FCS und mit Zusatz von gepooltem humanem AB-Serum

Serumart	Serumkonzentration	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml
FCS	2,5%	9,5	240,1	129,1
ABS	2%	0,9	229,0	51,3
ABS	5%	1,7	177,7	43,8
ABS	10%	1,2	100,1	18,6

3. Lymphoproliferation und Interferoninduktion in humanem Vollblut

3.1. Einfluß des Mischungsverhältnisses von Vollblut und Medium

Um das optimale Mischungsverhältnis von Vollblut und Medium festzulegen, wurde heparinisiertes venöses Blut in verschiedenen Verhältnissen mit RPMI 1640 gemischt (Tab. 4).

Tabelle 4. Lymphoproliferation (cpm x 10^3) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen von Blut/Medium

Vollbut Blut/Medium	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml	HSV-1
1/5	0,5	17,4	13,4	0,8
1/10	0,8	104,6	93,7	3,4
1/15	0,3	108,1	41,7	8,3
1/20	0,8	61,5	46,9	6,6

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, erwies sich das Mischungsverhältnis 1/15 - dies entspricht bei gesunden Erwachsenen etwa einer Leukozytenzahl von 10^6/ml - am günstigsten. Somit ergibt sich bei dieser Verdünnung eine einfache Methode, um auch kleinste Blutmengen, z.B. von Säuglingen, auf die Fähigkeit, auf verschiedene Stimulantien zu proliferieren, austesten zu können. In den nachfolgenden Experimenten wurde das Mischungsverhältnis von 1/10 oder 1/15 verwendet.

Für die Interferonproduktion ergab sich ein ähnliches Ergebnis (Tab. 5). Auch hier wurde routinemäßig eine Blut-Medium Mischung von 1/10 verwendet.

Tabelle 5. Interferonproduktion (I.E./ml) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen von Blut/Medium

Vollblut Blut/Medium	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml	HSV-1
1/5	3	54	27	27
1/10	3	243	243	243
1/15	3	243	162	162
1/20	3	162	54	81

3.2. Einfluß von fetalem Kalbsserum (FCS)

Um festzustellen, ob ein Zusatz von FCS die Proliferationsrate und Interferonproduktion steigerte, wurde in einigen Versuchen das autologe Serum durch Zentrifugation der Zellen entfernt, die Zellen in Medium aufgenommen und ihnen verschiedene Konzentrationen von FCS zugesetzt. Der Zusatz von FCS brachte keinen wesentlich steigernden Effekt der Proliferation und Interferonproduktion. Deshalb wurde FCS in den weiteren Experimenten mit Vollblut nicht verwendet.

3.3. Einfluß von autologem und allogenem Serum

Analog zu 3.2. wurde untersucht, ob durch autologes oder durch gepooltes humanes AB-Serum im Vollbluttest ein positiver Einfluß auf die Lymphozytenstimulation und Interferonproduktion erzielt werden konnte. Dabei stellte sich heraus, daß mit allogenen Serumzusätzen niedrigere Proliferationswerte und Interferontiter erreicht wurden als mit autologem Serum (Tab. 6, Tab. 7). In den folgenden Experimenten wurden die Vollblutkulturen mit autologem Serum inkubiert.

Tabelle 6. Lymphoproliferation (cpm x 10^3) in Vollblutkulturen mit autologem und allogenem Serum

Spender	Serumart	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	CON A 6,25 µg/ml	PWM 10 µg/ml
1	autologes	0,3	41,2	16,5	2,7
	allogenes	0,5	18,3	8,0	0,8
2	autologes	0,4	89,3	31,2	2,7
	allogenes	0,5	41,2	20,8	1,9
3	autologes	0,3	48,2	19,6	1,9
	allogenes	0,3	41,1	10,8	0,8

Tabelle 7. Interferonproduktion (I.E./ml) in Vollblutkulturen mit autologem und allogenem Serum

Spender	Serumart	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml	PWM 10 µg/ml
1	autologes	3	49	43	14
	allogenes	3	5	3	3
2	autologes	3	84	67	17
	allogenes	3	7	11	2
3	autologes	3	48	17	7
	allogenes	3	13	9	3

3.4. Austestung verschiedener Kulturmedien

Um ein optimales Kulturmedium zu finden, wurden zwei Standardmedien ausgetestet. Es wurden pro Medium 18 Vollblutproben von verschiedenen gesunden Individuen ausgetestet und mit verschiedenen Mitogenen, einem bakteriellen Antigen und zwei viralen Antigenen, stimuliert. Den Vollblutsuspensionen wurde kein weiteres Serum zugesetzt.

Die Ergebnisse (Abb. 11) zeigen, daß sich in der Vollbluttechnik das Medium RPMI 1640 wesentlich besser eignet als das Medium M199. Auf alle Stimulantien wurden mit dem Medium M199 weit geringere Proliferationsdaten erzielt, was zur Folge hatte, daß Vollblutproben, die mit RPMI 1640 positive Stimulationswerte erreichten, mit M199 im negativen Bereich blieben. Bei allen Versuchen und Patientenuntersuchungen wurde somit das Vollblut mit RPMI 1640 verdünnt.

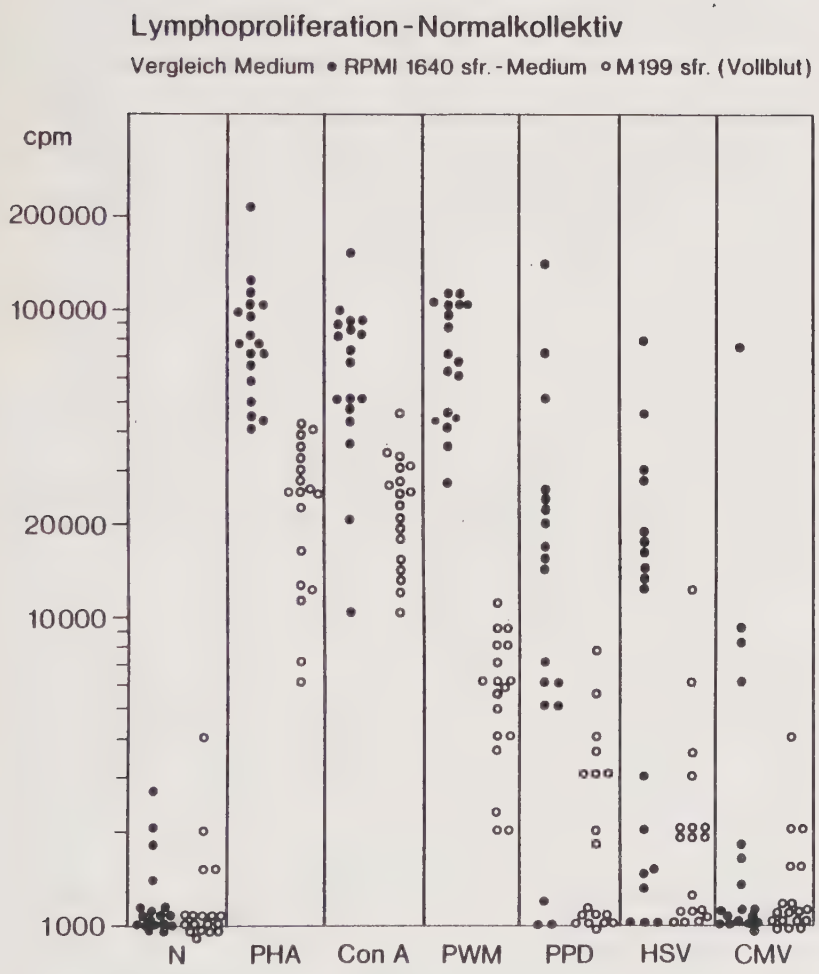


Abb. 11. Vergleich der Medien RPMI 1640 und M199 in Lymphoproliferationsversuchen.

3.5. Einfluß der Lagerungszeit und der Temperatur auf die Lymphoproliferation und Interferonproduktion

Es wurde untersucht, ob eine Lagerung der Blut/Medium Mischung vor der Aufarbeitung die Proliferationsrate und die Höhe des Interferontiters beeinflußt. Weder eine Lagerung bei 4°C noch bei Raumtemperatur beeinflußte innerhalb von 24 Std. die Lymphoproliferation und Interferonproduktion. Allerdings mußte das Blut mit Medium gemischt werden, eine Lagerung des unverdünnten heparinisierten Vollbluts erwies sich als nicht vorteilhaft. Somit ist es möglich, entnommene Blutproben auch am nachfolgenden Tag im Labor zu verarbeiten.

3.6. Kinetik der Lymphoproliferation

Zuerst wurde die optimale Inkubationsdauer ausgetestet. Dabei zeigte sich für die Mitogene eine optimale Inkubationszeit von 3 bis 4 Tagen, danach ging die Proliferationsrate langsam zurück. Für das bakterielle Antigen Tuberculin PPD und die zwei viralen Antigene HSV und CMV zeigte sich allerdings erst ab Tag 7 ein Inkubationsoptimum.

Für diesen Versuch wurden 8 Vollblutproben von gesunden erwachsenen Blutspendern abgenommen, diese mit Medium wie beschrieben verdünnt und mit dem bakteriellen Antigen Tuberculin PPD, den viralen Antigenen HSV und CMV stimuliert, die Proben auf Mikrotiterplatten verteilt und bei 37°C, 5% CO_2 und 95% rel. Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für Tuberculin PPD beträgt die optimale Inkubationszeit 7 Tage (Abb. 12). Für HSV erwies sich eine Inkubationszeit von 7 bis 8 Tagen optimal (Abb. 13). Für CMV hingegen schien zum Teil eine Steigerung auch über den 8. Tag hinaus erreichbar zu sein (Abb. 14). In den weiteren Versuchen wurde die Inkubationszeit auf 6 Tage festgelegt, da ja nicht nur die Antigen-bedingte, sondern auch die Mitogen-bedingte Proliferation gemessen werden sollte.

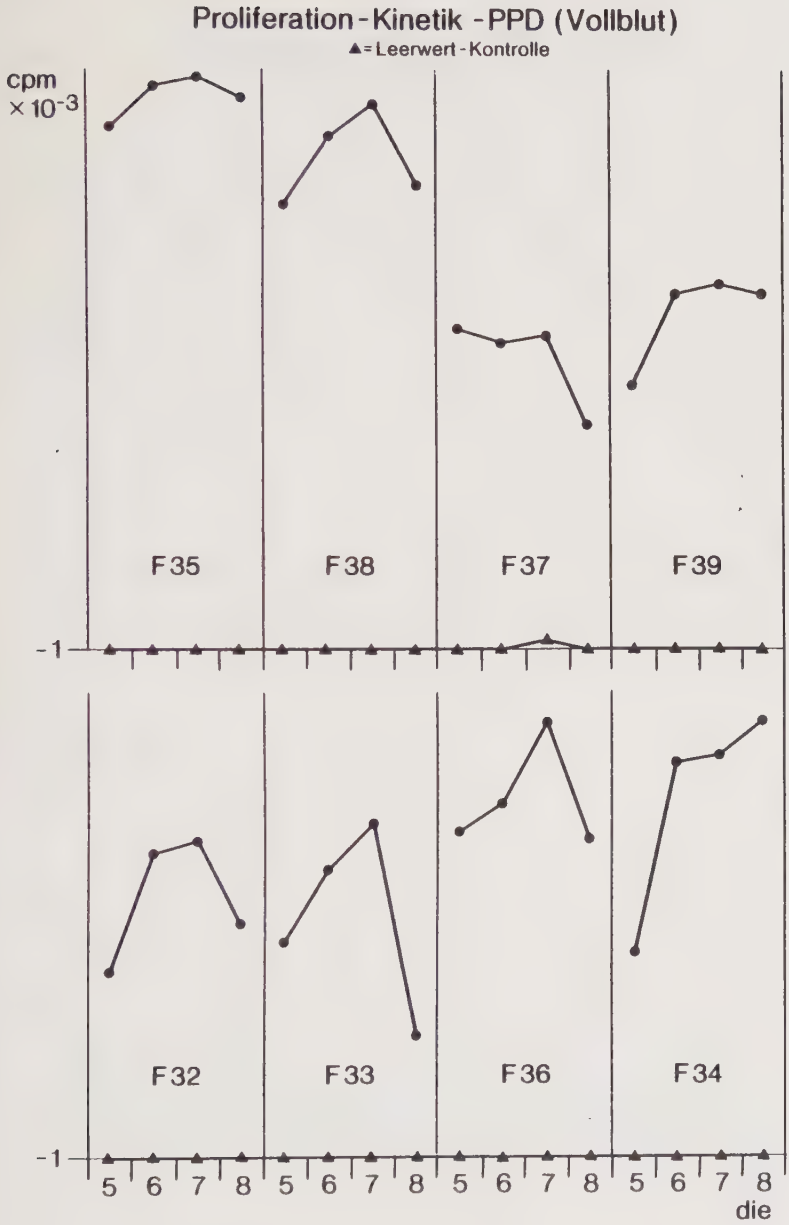


Abb. 12. Kinetik der Lymphoproliferation für Tuberculin PPD

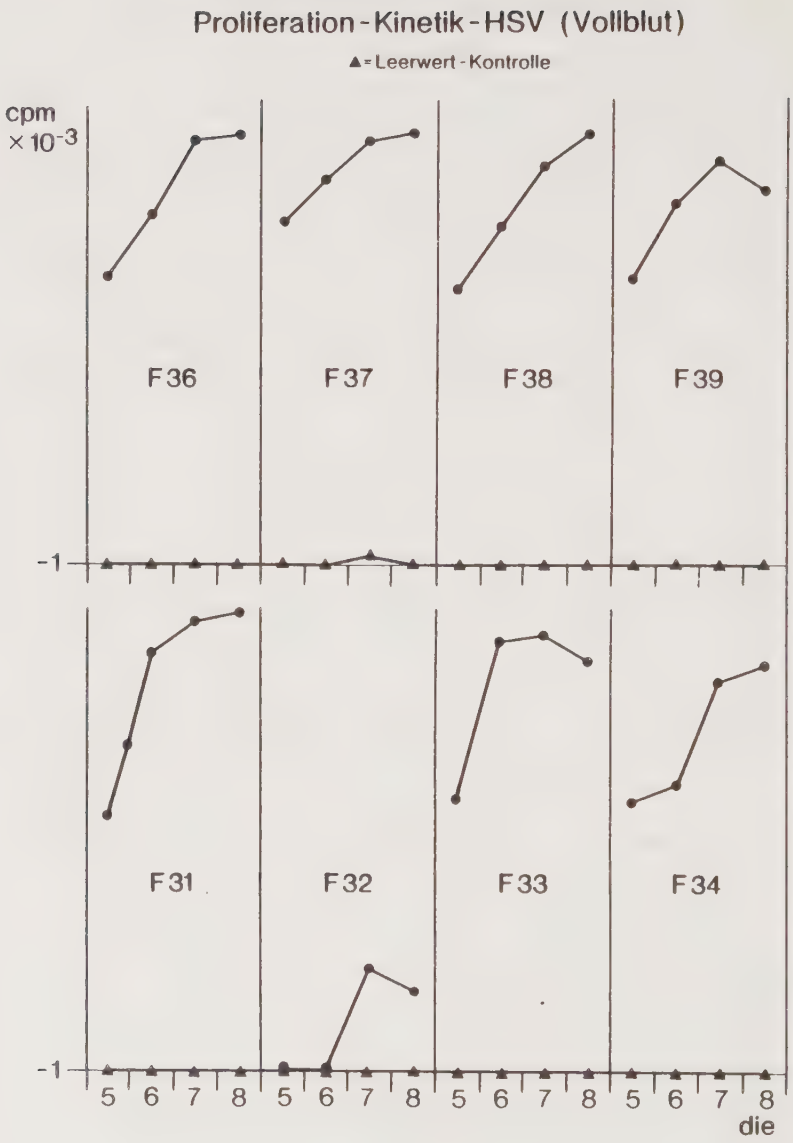


Abb. 13. Kinetik der Lymphoproliferation für HSV

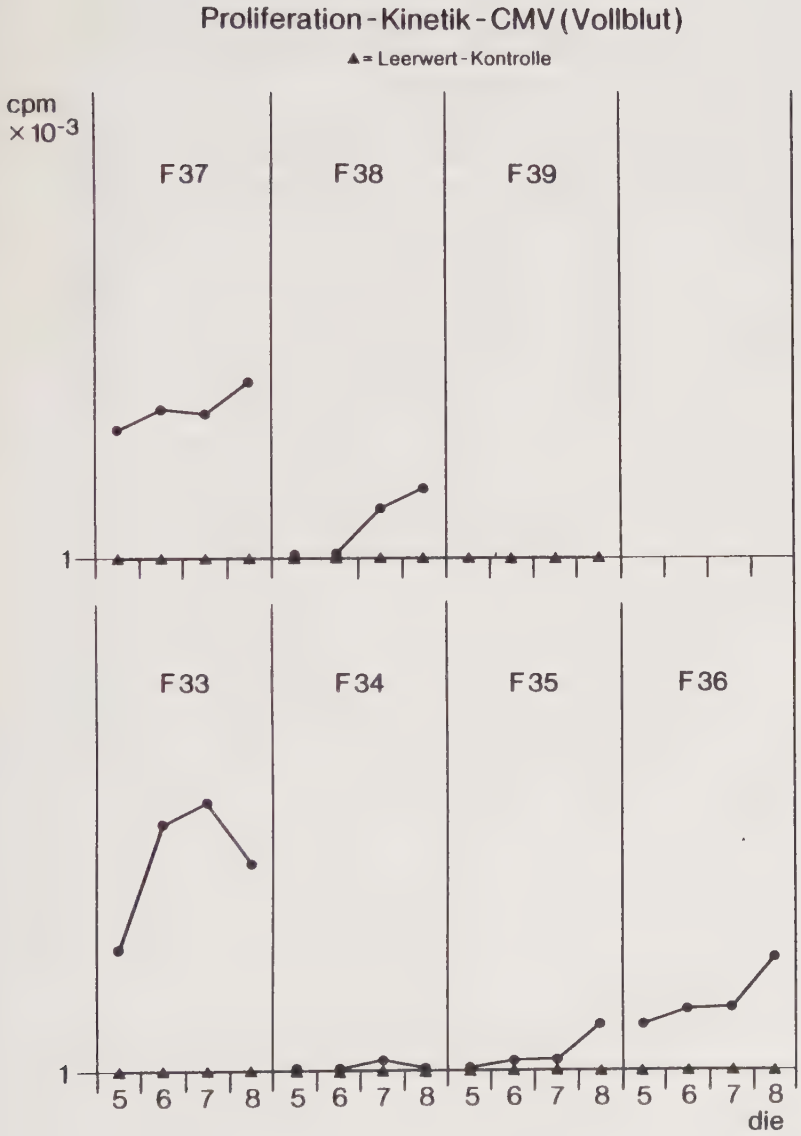


Abb. 14. Kinetik der Lymphoproliferation für CMV

Anschließend wurde die optimale Mitogen- bzw. Antigenkonzentration festgelegt. Dabei ergab sich für die Mitogene PHA und Con A eine optimale Konzentration von 6,25 µg/ml. Für Pokeweed Mitogen ergibt sich aus Tabelle 8 eine optimale Konzentration von 10 µg/ml.

Tabelle 8. Untersuchungen zur optimalen PWM-Konzentration (cpm x 10^3)

Induzent µg/ml	Vollblut-Proben 1	2	3	4
Kontrolle	2,0	0,8	1,9	1,3
PWM 5	87,1	39,7	65,2	33,2
10	115,3	87,7	72,1	79,6
20	92,5	90,3	59,7	70,6
30	74,6	68,0	68,9	49,2
40	87,4	80,5	64,2	42,0
50	68,5	62,5	54,7	39,0

Für das bakterielle Antigen Tuberculin PPD wurde die Konzentration auf 10 µg/ml festgelegt. Die viralen Antigene HSV und CMV wurden in Konzentrationen von 1 x 10^7 physikalische Partikel/ml bzw. 1 x 10^6 physikalische Partikel/ml eingesetzt.

3.7. Kinetik der Interferonproduktion

Auch hier wurde zuerst die optimale Inkubationszeit ausgetestet. Die Ansätze wurden 24 Std., 48 Std. und 72 Std. inkubiert. Für die Mitogene konnten die höchsten Interferontiter nach 72 Std. gemessen werden, für das virale Antigen HSV-1 zeigte sich jedoch, daß das Inkubationsoptimum bei 24-48 Std. lag und daß danach der Interferontiter wieder sank. Weiter stellte sich heraus, daß das bakterielle Antigen Tuberkulin PPD und das virale Antigen CMV AD169 bei diesen Testbedingungen schlechte Interferoninduzenten waren (Tab. 9). Die optimale Mitogenkonzentration betrug auch hier für PHA und Con A jeweils 6,25 µg/ml. Für PWM lag die optimale Konzentration bei 10 µg/ml (Tab. 10).

Tabelle 10. Untersuchungen zur optimalen PWM-Konzentration

Induzent µg/ml		IFN (I.E./ml)
Kontrolle		3
PWM	5	18
	10	54
	20	54
	30	54
	40	54
	50	162

Tabelle 9. Festlegung der optimalen Inkubationsdauer (I.E./ml)

Spender	Inkubationszeit in h	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml	PPD 10 µg/ml	HSV-1	CMV
	24	3	27	27	6	54	3
1	48	3	54	54	6	54	3
	72	3	243	162	9	27	3
	24	3	81	54	3	54	3
2	48	3	162	162	3	27	3
	72	3	162	162	3	18	3
	24	3	54	18	3	81	3
3	48	3	81	27	3	81	3
	72	3	162	54	3	54	3
	24	3	27	9	3	27	3
4	48	3	27	27	3	54	3
	72	3	81	18	3	18	3

3.8. Einfluß verschiedener Mikrotiterplatten auf die Lymphoproliferation

Für Proliferationsversuche in Kulturen mit isolierten Lymphozyten werden routinemäßig Mikrotiterplatten mit Flachboden verwendet; es werden sowohl nach Mitogenstimulation als auch nach Antigenstimulation in diesem System gute Proliferationswerte gemessen. Angesichts dieser Erfahrungen wurde im Vollbluttest anfänglich ebenfalls in Flachbodenplatten inkubiert. Es stellte sich aber in vergleichenden Versuchen zwischen isolierten Lymphozytenkulturen und Vollblutkulturen heraus, daß zwar auf Stimulation mit den Mitogenen PHA und Con A vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden, daß aber auf Stimulation mit dem Antigen PWM und den Antigenen PPD, HSV und CMV im Vollblut die Werte wesentlich niedriger lagen.

Um dieses Phänomen zu klären, wurden sodann Vollblutkulturen parallel in Flachbodenplatten und Rundbodenplatten kultiviert. Die Ergebnisse, die in Tab. 11 und graphisch in Abb. 15 dargestellt sind, zeigen, daß für die Lymphozytenstimulation im Vollblut die richtige Wahl der Mikrotiterplatten sehr wichtig ist. Wenn man Vollblutkulturen in Rundbodenplatten inkubiert, werden auf Stimulation mit PHA und Con A im Vergleich zu Flachbodenplatten zwar ähnliche Ergebnisse erzielt, auf PWM und vor allem auf die Antigene PPD, HSV und CMV aber wesentlich höhere Stimulationswerte gemessen. Werte, die in Flachbodenplatten als negativ erschienen, konnten in Rundbodenplatten zu positiven Ergebnissen werden. Somit ist es von zwingender Notwendigkeit, Vollblutkulturen für Proliferationsexperimente in Mikrotiter-Rundbodenplatten zu kultivieren, um auszuschließen, daß durch Verwendung von Flachbodenplatten eventuell positiv reagierende Individuen nicht erkannt werden. Analog dazu wurden auch alle Interferonansätze in Rundbodenplatten kultiviert.

Tabelle 11. Lymphozytenstimulation im Vergleich zwischen Mikrotiterplatten mit Rundboden und Flachboden (cpm x 10^3)

Spender	Mikrotiterplatte (Flach/Rund)	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml	PWM 10 µg/ml	PPD 10 µg/ml	HSV-1	CMV
1	Flach	0,8	27,3	41,2	3,8	8,5	2,1	1,6
	Rund	1,1	206,1	32,6	21,2	55,1	65,2	4,2
2	Flach	0,9	32,3	39,2	1,7	1,2	2,1	2,0
	Rund	1,6	48,1	39,8	4,7	74,8	12,3	7,4
3	Flach	1,0	56,4	76,5	5,4	70,4	0,8	0,8
	Rund	1,8	156,8	33,3	4,9	110,9	3,5	2,7
4	Flach	0,9	74,4	76,7	2,2	4,1	0,9	0,8
	Rund	1,6	155,8	77,1	23,8	12,0	1,2	0,9
5	Flach	0,9	89,9	49,2	2,0	82,3	3,2	7,7
	Rund	0,9	84,6	20,6	5,6	81,2	10,2	25,2

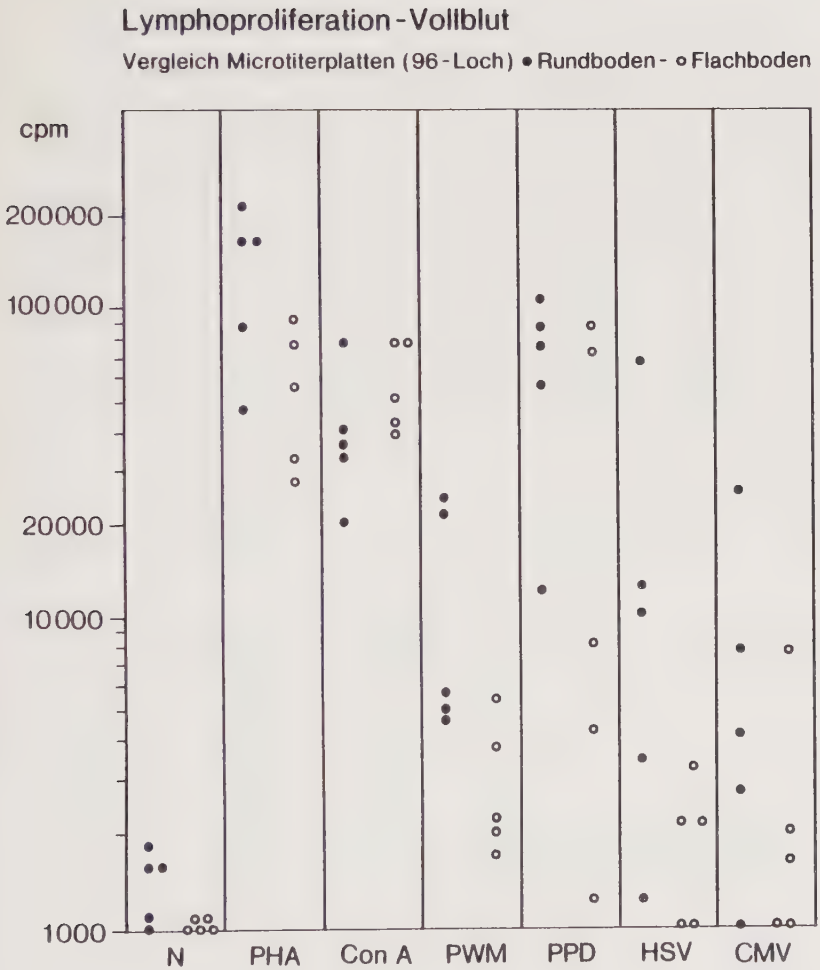


Abb. 15. Vergleich von Mikrotiterplatten mit Rundboden und Flachboden auf die Lymphoproliferation.

3.9. Einfluß des CO_2-Gehalts in Inkubatoren auf Lymphoproliferation und Interferonproduktion

Um optimale Stimulations- und Interferonwerte zu erhalten, müssen während der Inkubation der stimulierten Lymphozyten verschiedene Bedingungen erfüllt werden. Es sollten eine Inkubationstemperatur von 37°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 95% vorherrschen. Von entscheidender Wichtigkeit ist die CO_2-Begasung des Brutschranks. Es stellte sich bei mehreren Versuchen heraus, daß die CO_2-Konzentration unbedingt 5% betragen muß, und daß gewährleistet werden muß, daß während der Inkubationsdauer der CO_2-Gehalt nicht abfällt, was z.B. durch wiederholtes Öffnen des Brutschranks eintreten kann. Ein Abfall des CO_2-Gehalts kann sowohl für Lymphoproliferations- als auch für Interferonversuche zur Folge haben, daß weit geringere Ergebnisse gemessen werden, wie in Tab. 12 und Tab. 13 zu sehen ist.

Tabelle 12. Einfluß des CO_2-Gehalts in Brutschränken auf die Lymphoproliferation (cpm x 10^3)

CO_2-Gehalt %	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml
5	0,4	93,7	105,9
3,8	0,4	37,9	45,0

Tabelle 13. Einfluß des CO_2-Gehalts in Brutschränken auf die Interferonproduktion (I.E./ml)

CO_2-Gehalt %	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml
5	3	54	54
3,8	3	3	6

3.10. Einfluß verschiedener Antikoagulantien auf Lymphoproliferation und Interferonproduktion

Mit Einmalspritzen wurde venöses Blut aus der Armvene gewonnen. Die Spritzen enthielten entweder 50 I.E./ml Heparin-Natrium oder 0,1 mol/l Natrium-Citrat. Als weiteres wurde Kalium-EDTA als Antikoagulans ausgetestet, hier wurde das abgenommene Blut in mit K-EDTA beschichtete Röhrchen pipettiert. Die Tab. 14 und Tab. 15 zeigen, daß für die Lymphoproliferation von Vollblutkulturen mit Na-Citrat wesentlich niedrigere Proliferationswerte gemessen werden als mit Heparin-Na. Betreffs K-EDTA wurden negative Ergebnisse erhalten.

Für die Interferonproduktion zeigte sich zwischen Heparin-Na und Na-Citrat kein beträchtlicher Unterschied in den Interferontitern. Im Falle von K-EDTA allerdings wurden weit geringere Titer gemessen. In den Folgeversuchen wurde somit Vollblut mit heparinisierten Einmalspritzen abgenommen.

Tabelle 14. Einfluß verschiedener Antikoagulantien auf die Lymphoproliferation (cpm x 10^3)

Antikoagulans	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml	PPD 10 µg/ml	CMV
Heparin-Na	0,6	101,3	40,8	8,5	25,7
Na-Citrat	0,7	48,3	32,9	1,4	4,9
K-EDTA	0,8	1,2	0,8	1,5	1,2

Tabelle 15. Einfluß verschiedener Antikoagulantien auf die Interferonproduktion (I.E./ml)

Antikoagulans	Kontrolle	PHA 6,25 µg/ml	Con A 6,25 µg/ml	PPD 10 µg/ml	CMV
Heparin-Na	3	243	162	54	3
Na-Citrat	3	162	243	54	6
K-EDTA	3	27	18	3	6

3.11. Lymphozytenstimulation und Interferonproduktion im Vergleich zwischen Vollblut und isolierten Lymphozyten

Blutproben von 18 gesunden erwachsenen Blutspendern wurden hinsichtlich ihrer Proliferations- und Interferonproduktionsfähigkeit im Vollbluttest und in isolierten Lymphozytenkulturen untersucht. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Lymphozytenzahl im Vollblut durch Verdünnung der Zahl der isolierten Lymphozyten angeglichen. Bezüglich der Lymphoproliferation (Abb. 16) wurde nach Stimulation mit PWM im Vollbluttest und in isolierten Lymphozytenpräparationen vergleichbare Stimulationswerte gefunden. Nach Stimulation mit PHA und Con A hingegen war die Lymphoproliferation im Vollbluttest signifikant erhöht. Für PHA wurde das Signifikanzniveau auf $p = 0,05$ und für Con A auf $p = 0,01$ festgelegt.

Auch die Interferonproduktion (Abb. 17) war im Vollbluttest bezüglich PHA, Con A und PWM deutlich erhöht. Es wurden Interferontiter erzielt, die bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,01$ um das 4- bis 10-fache höher waren als in isolierten Lymphozytenkulturen.

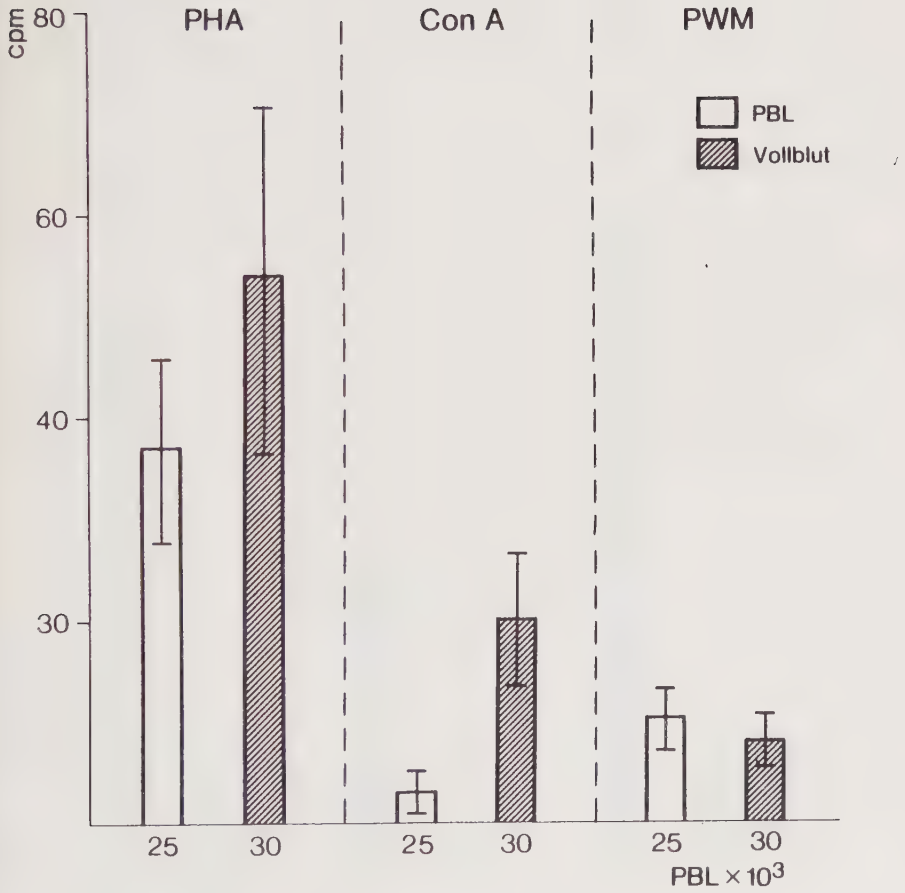


Abb. 16. Lymphoproliferation im Vergleich zwischen peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) und Vollblut.

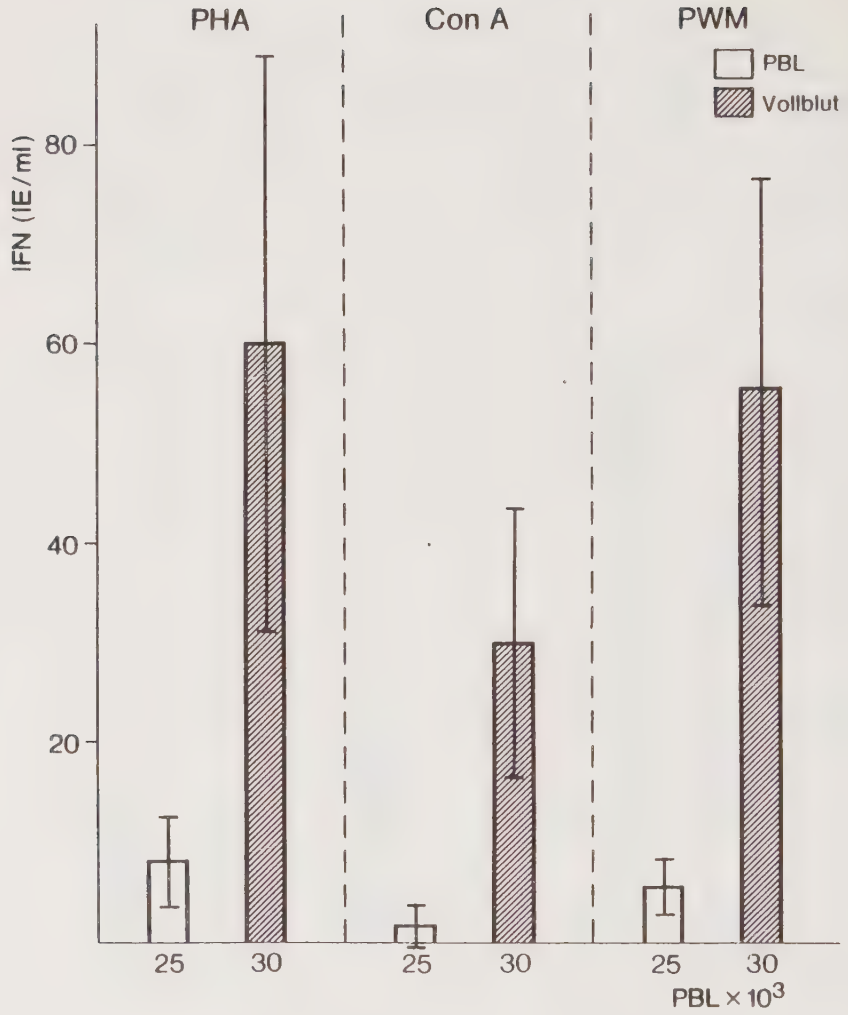


Abb. 17. Interferonproduktion im Vergleich zwischen peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) und Vollblut.

3.12. Untersuchungen bei falsch-positiven Interferontitern in menschlichem Serum und Plasma

Bei der Interferontitration in Vollblut wurden häufig hohe Kontrollwerte gefunden, d.h., unstimulierte Vollblutproben, die nach Inkubation und dann nach Interferontitration einen scheinbaren Interferontiter von bis zu 18 I.E./ml aufwiesen. Da in Parallelversuchen mit isolierten Lymphozyten der gleichen Spender keine Titer gefunden wurden, stellte sich nun die Frage, ob es sich hier um ein Artefakt handelte oder ob tatsächlich Interferon im Vollblut, d.h. im Serum vorhanden war. Dafür wurden Serum- und Plasmaproben auf Interferon untersucht, die von gleichen Spendern stammten. Die Proben wurden im Interferontest mit Medium RPMI 1640 verschieden verdünnt. Abb. 18 zeigt, daß je höher die Verdünnungsstufe des Serums bzw. des Plasmas war, desto niedriger wurde der gefundene Titer. Als nächster Schritt wurde versucht, ob die Titer sich durch Zugabe von Anti-Interferon, also durch Neutralisation reduzieren ließen. Dies war weder mit Anti-α-IFN noch mit Anti-γ-IFN der Fall. Somit wurde der Schluß gezogen, daß es sich hier nicht um Interferontiter handeln konnte. Vielmehr ließ sich dieses Phänomen bei der Interferontitration reduzieren, nachdem die inkubierten Testüberstände vor der Infektion mit VSV (s. IV.9.) zweimal mit Medium gewaschen worden waren. Es wird vermutet, daß es sich hier um eine Kreuzreaktion zwischen VSV und Antikörper im Serum handeln könnte, die VSV neutralisieren. Diese Antikörper können aber durch den zweimaligen Waschvorgang aus den Testüberständen entfernt werden.

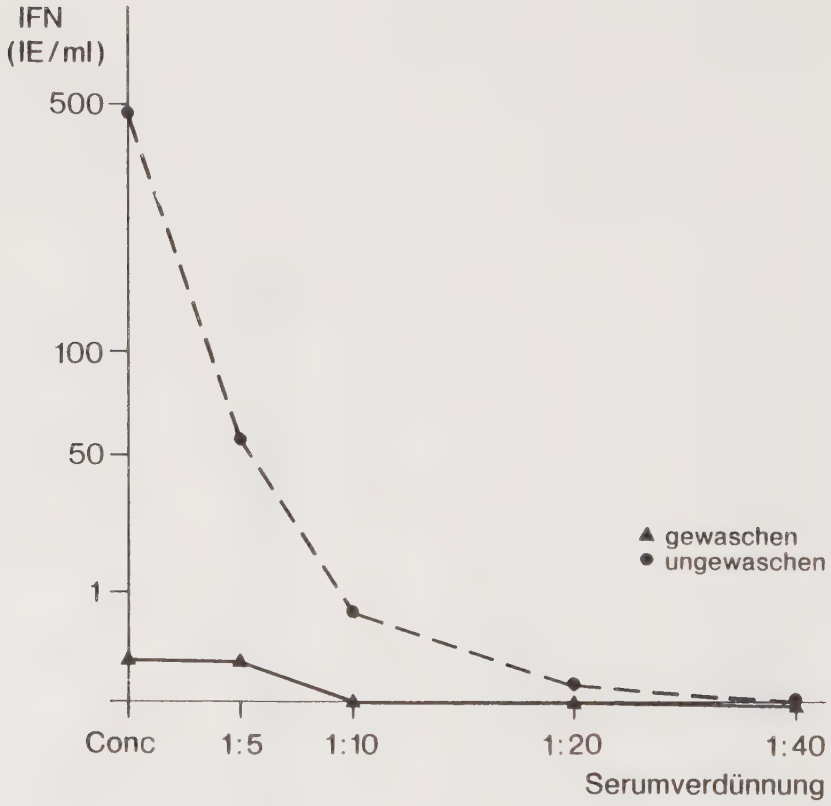


Abb. 18. Interferontitration von verschiedenen Serumverdünnungen.

4. Untersuchungen zu verschiedenen Inaktivierungsmethoden der viralen Antigene

4.1. Einfluß verschiedener Inaktivierungsmethoden von Herpes Simplex Virus Stamm WAL

Neben den Mitogenen wurden auch Antigene als Stimulantien der Lymphozytenkulturen eingesetzt, darunter das virale Antigen HSV-1 WAL. Dabei wurde das Virus durch verschiedene Methoden inaktiviert. In mehreren Versuchen wurden durch Hitze-inaktivierte (1 Stunde bei 56°C), UV-Licht bestrahlte (90 Minuten bei 80 erg$\frac{mm^2}{sec}$) und mit Ether behandelte Präparationen mit unbehandeltem HSV-1 WAL verglichen. Durch Plaque-Test wurde sichergestellt, daß die Infektiosität des Virus nicht mehr bestand. Es zeigte sich, daß Hitze- und UV-behandeltes Virus gleich gut stimulierten, wogegen die mit Ether behandelte Präparation an Stimulationsfähigkeit verloren hatte. Routinemäßig wurde in den Versuchen daraufhin hitzeinaktiviertes HSV-1 WAL eingesetzt.

4.2. Einfluß verschiedener Inaktivierungsmethoden von HCMV

Auch bei HCMV ergab sich aus den gleichen Gründen wie bei HSV-1 die Frage der besten Inaktivierungsmethode. Es wurden Präparationen verglichen, die durch Hitze (1 Stunde bei 56°C) und UV-Licht-Bestrahlung (90 Minuten bei 80 erg$\frac{mm^2}{sec}$) inaktiviert wurden. Auch hier wurde der Verlust der Infektiosität durch Plaque-Test sichergestellt. Es zeigte sich wie bei HSV kein Unterschied der Stimulationswerte zwischen den beiden inaktivierten Präparationen, im folgenden wurde somit bei diesem Virus die UV-Inaktivierung angewendet.

5. Untersuchungen von Kontrollpersonen

5.1. Untersuchung eines Normalkollektivs

Um die zellvermittelte Immunität gegenüber CMV und HSV untersuchen zu können, wurde eine Vollbluttechnik entwickelt und mit einem Normalkollektiv etabliert. Das Normalkollektiv bestand aus 104 gesunden erwachsenen Blutspendern verschiedenen Alters und beiden Geschlechts; diese Blutspender wurden über einen Zeitraum von mehreren Monaten hinweg untersucht (Tab. 16). Den Vollblutproben dieser Probanden wurden folgende Stimulantien zugesetzt: drei unspezifische Mitogene (PHA, Con A, PWM), ein bakterielles Antigen (PPD) und zwei virale Antigene (HSV, CMV).- In den ersten Experimenten wurde als Kontrollpräparation nichtinfizierte HEL-Zellen, die zur Züchtung von CMV dienten, eingesetzt. Diese Kontrollpräparation zeigte keine signifikante Änderung der Leerwerte, und somit wurde bei späteren Experimenten auf diese Kontrolle verzichtet.

Die Lymphozyten aller Spender reagierten mit guten Ergebnissen auf alle drei Mitogene. Die Lymphozyten der meisten Spender reagierten auch auf PPD und HSV, wohingegen nur eine begrenzte Anzahl der Blutproben auf CMV positive Ergebnisse lieferten. Diese Ergebnisse waren eindeutig positiv und bei Wiederholungsexperimenten zeigten sich nur geringe Schwankungen in der Größenordnung der erzielten Werte. Daraus läßt sich schließen, daß es sich hier nicht um Artefakte, sondern um echte Lymphoproliferationswerte handelt.

Parallel zur Lymphozytenstimulation wurden mittels eines ELISA-Tests gegen HSV und CMV IgG-Antikörper und zusätzlich gegen CMV IgM-Antikörper bestimmt (Tab. 16). Nur ein Proband wies einen positiven IgM-Titer gegen CMV auf. HSV betreffend wurde eine weitgehende Korrelation serologischer Befunde mit dem Vollbluttestsystem gefunden (Tab. 17). In 89 Fällen wurden Ergebnisse erzielt, die mit der im ELISA getesteten Seroreaktion in Übereinstimmung

Tabelle 16. Untersuchung der Lymphozytenstimulation in Vollblutkulturen von 104 gesunden erwachsenen Blutspendern nach Zugabe verschiedener Mitogene, PPD und zwei Viruspräparationen HSV und CMV (cpm x 10^3)

Pat.	Kontrolle	PHA	Con A	PWM	PPD	HSV-1	SD*	CMV	SD*
1	1.0	95.7	57.9		4.3	11.0	+	1.6	+
2	4.8	53.3	80.6		45.1	16.5	+	1.8	-
3	1.9	99.5	108.4		5.8	2.0	-	1.3	-
4	0.7	39.3	43.5		2.6	7.0	+	17.3	+
5	3.9	156.5	98.5		32.9	66.9	+	3.0	-
6	5.9	76.8	71.8		39.2	3.8	-	119.6	+**
7	1.6	97.1	79.6		15.6	38.9	+	0.8	-
8	2.7	223.4	145.0	104.8	140.3	11.6	+	72.2	+
9	2.0	70.2	92.0	114.1	5.8	1.3	+	1.8	-
10	0.8	83.4	85.0	87.4	19.6	26.6	+	1.1	+
11	1.8	42.6	47.5	71.9	13.5	1.4	-	1.6	-
12	3.9	94.6	44.0	76.3	99.4	3.4	+	1.4	-
13	0.6	36.7	71.9	50.6	2.0	5.8	+	1.5	-
14	1.3	107.3	64.3	78.9	3.8	7.6	+	1.9	+
15	0.7	138.2	76.8	79.6	130.7	24.2	+	35.7	+
16	1.0	103.1	41.2		23.6	0.8	-	1.5	-
17	0.9	119.9	30.4		153.4	21.2	+	3.5	-
18	0.7	104.4	27.4		4.5	2.8	-	2.9	+
19	1.2	80.2	66.1		14.2	30.9	+	12.0	+
20	1.2	128.4	90.9		72.7	4.3	+	1.2	-
21	1.8	114.9	66.9		1.2	26.2	-	2.9	-
22	0.9	64.2	53.9		28.4	4.1	-	0.7	-
23	1.1	190.4	35.0	106.2	58.6	6.4	-	5.4	-
24	0.8	77.4	76.7	98.8	1.5	12.4	-	1.1	+
25	1.4	86.2	78.4	113.4	7.2	19.5	+	3.2	+
26	0.4	70.5	18.1	46.8	69.8	2.0	+	0.2	-
27	0.3	49.4	10.3	27.0	5.9	3.0	+	0.7	-
28	1.4	43.6	19.2	62.1	2.0	12.7	+	1.1	+
29	0.1	43.7	49.2	66.9	5.0	0.9	-	0.2	-
30	0.3	100.3	80.0	35.2	1.2	0.5	-	0.2	-
31	0.9	94.3	90.5	41.9	6.8	0.2	-	1.3	+
32	0.2	117.9	78.8	59.1	51.5	13.2	+	9.2	+
33	0.2	65.2	35.4	103.9	21.4	28.1	+	0.3	+
34	0.7	72.2	50.8	100.5	16.3	17.4	+	5.9	+
35	0.4	94.3	94.3	95.7	0.9	78.5	+	0.7	+
36	0.5	57.5	42.5	41.8	0.8	18.7	+	0.2	-
47	0.2	113.4	84.9	111.1	23.3	44.4	-	7.8	+
38	0.3	30.1	57.8	73.5	1.1	0.2	-	0.2	-
39	0.2	28.7	54.3	27.9	7.7	0.3	-	0.3	-
40	0.5	61.6	75.2	74.9	2.2	11.6	-	0.6	+
41	0.1	59.1	71.7	49.7	20.9	0.3	-	0.2	-
42	0.2	27.3	24.9	47.4	10.9	11.9	+	16.1	+
43	0.4	101.4	71.2	101.9	15.1	16.3	+	0.4	-
44	0.3	49.7	32.8	51.3	63.4	5.0	+	28.8	+
45	0.3	59.7	45.0	41.9	15.8	19.4	+	3.5	-
46	0.4	52.4	47.3	96.1	27.9	7.2	+	0.4	-
47	0.2	47.3	62.5	38.7	12.4	31.4	+	0.3	-
48	0.3	65.8	52.9	50.0	55.1	16.8	+	1.7	-
49	0.4	74.8	43.5	38.3	4.4	1.2	-	0.5	-
50	0.7	50.8	67.0	1.6	1.7	0.8	-	1.1	-

Fortsetzung Tabelle 16.

51	0.5	101.9	58.7	31.4	7.3	0.5	-	15.9	+
52	0.4	107.9	79.7	85.4	1.7	15.4	+	0.6	+
53	0.6	108.5	41.3	59.4	11.0	11.2	+	7.8	-
54	0.3	55.2	51.2	53.1	37.5	8.2	+	4.2	+
55	0.4	31.5	18.0	6.0	0.7	2.1	+	4.6	+
56	0.3	31.2	11.8	22.1	0.7	7.3	+	0.3	+
57	0.9	52.9	25.7	25.9	20.0	6.8	+	18.0	+
68	0.4	30.3	37.5	32.7	2.1	19.6	+	0.2	-
59	0.3	15.3	26.3	48.9	1.9	0.2	-	0.3	+
60	0.3	31.9	30.3	28.3	3.0	4.4	+	15.1	+
61	0.4	46.7	62.7	57.1	25.6	43.9	+	16.1	-
62	0.5	70.3	49.6	38.9	1.1	4.8	+	0.9	-
63	1.6	67.3	44.9	74.0	9.9	3.3	-	0.8	+
64	0.9	94.2	56.8	30.6	18.3	17.1	+	2.2	-
65	0.5	32.1	89.4	128.3	11.5	38.4	+	0.6	-
66	0.8	106.9	128.2	20.4	40.0	0.6	-	2.0	-
67	1.0	97.8	78.6	79.3	3.1	17.3	+	1.5	-
68	0.4	63.6	83.5	96.0	45.9	29.6	+	14.5	+
69	0.2	56.4	72.9	16.4	0.8	0.6	+	1.2	-
70	0.8	52.9	77.6	72.5	21.6	16.9	+	4.3	+
71	0.4	68.8	77.8	68.5	3.1	5.4	+	5.4	+
72	0.4	74.2	35.7	91.2	12.9	25.6	+	0.9	-
73	1.7	63.9	42.9	64.6	15.3	22.3	+	0.2	-
74	0.2	72.2	11.6	77.9	36.7	7.6	+	0.5	+
75	0.3	150.3	45.2	88.9	11.8	25.2	+	9.8	+
76	1.8	113.1	79.3	71.7	14.1	5.4	+	3.2	+
77	1.0	77.6	34.8	35.5	0.9	5.1	+	0.3	-
78	0.5	47.6	46.1	56.2	7.7	0.7	+	0.2	-
79	0.3	1.8	21.7	16.4	18.5	1.0	+	0.1	-
80	0.1	6.3	45.1	34.6	15.8	2.6	-	2.7	-
81	0.2	2.5	52.2	59.6	23.0	0.2	-	0.2	-
82	0.6	86.8	80.5	58.8	2.4	21.9	+	7.7	+
83	0.8	40.8	52.8	23.4	64.8	5.2	+	13.0	+
84	0.3	72.2	23.2	61.9	5.7	21.9	+	2.3	-
85	1.1	90.7	52.7	116.0	23.3	14.2	+	5.5	-
86	0.1	78.5	131.7	70.6	16.9	1.8	+	1.6	+
87	0.6	58.4	68.6	60.6	10.5	0.3	-	0.2	-
88	0.3	141.4	127.1	74.7	2.9	0.4	-	48.9	-
89	0.5	94.9	98.2	82.9	5.2	0.4	-	1.5	-
90	0.2	84.2	80.0	142.0	22.1	13.9	+	0.2	-
91	0.4	118.0	87.1	27.8	5.0	11.9	+	13.3	-
92	0.3	207.0	62.9	61.2	99.5	11.1	+	3.1	-
93	0.4	72.8	106.8	47.4	1.9	0.3	-	0.6	-
94	2.2	158.1	122.1	85.6	14.3	10.8	+	1.0	-
95	0.1	95.0	61.0	106.9	15.2	33.8	+	2.8	-
96	3.0	74.3	40.8	116.3	18.6	38.4	+	1.2	-
97	5.0	149.1	96.1	98.2	16.5	54.2	+	5.4	-
98	0.5	113.3	104.9	85.5	17.1	27.2	+	1.6	-
99	0.6	83.1	59.5	66.2	6.7	6.9	+	1.7	-
100	0.8	62.3	26.1	110.0	54.0	0.5	-	0.3	-
102	0.4	68.2	109.4	25.1	8.7	8.2	+	1.6	-
102	0.4	53.2	41.2	10.0	0.5	6.0	+	0.9	-
103	0.9	118.1	132.6	59.6	41.9	8.5	+	70.5	-
104	0.7	39.1	52.8	110.8	6.5	32.8	+	1.3	-

* Serologische Daten: IgG
** Serologische Daten: IgM

waren. Weitere 6 HSV-IgG-negative Patienten zeigten auf HSV eine positive Lymphozytenstimulation. Umgekehrt konnten bei 9 HSV-seropositiven Patienten keine erhöhten Stimulationswerte gemessen werden. Betreffend der Stimulationsdaten von CMV wurde das ursprüngliche Ziel, mit der Serologie übereinstimmende Ergebnisse zu bekommen, nicht erreicht (Tab. 18). Es ergaben sich in 78 Fällen Werte, die mit dem Serostatus der Spender übereinstimmten. Bei 19 seropositiven und 7 seronegativen Probanden konnten jedoch keine übereinstimmenden Resultate erzielt werden. Insgesamt waren 40 Spender im Antikörpertest positiv, aber nur 21 Spender reagierten im Lymphoproliferationstest. Die Mehrzahl der seronegativen Individuen war auch im Lymphoproliferationstest negativ.

Tabelle 17. Korrelation der serologischen Daten mit den Ergebnissen der Lymphozytenstimulation bezüglich HSV (Anzahl der Spender)

		Serologie	
		positiv	negativ
Lymphoproliferationstest	positiv	65	6
	negativ	9	24

Tabelle 18. Korrelation der serologischen Daten mit den Ergebnissen der Lymphozytenstimulation bezüglich CMV (Anzahl der Spender)

		Serologie	
		positiv	negativ
Lymphoproliferationstest	positiv	21	7
	negativ	19	57

Um die Ursachen dieser Diskrepanz zwischen den zellulären und humoralen Testergebnissen aufzuklären, wurden verschiedene Parameter untersucht, zunächst wurde bei einigen Spendern, die nicht in Tabelle 16 aufgeführt sind, die Vollblutmethode mit der herkömmlichen Methode, d.h., mit über Ficoll-Isopaque-Gradienten separierten peripheren Blutlymphozyten verglichen. Bezüglich CMV wurde gefunden, daß alle Spenderlymphozyten, die im Vollbluttest negativ reagierten, auch mit der herkömmlichen Methode negativ waren.

Eine mögliche Erklärung für die relativ geringe Anzahl der im Vollbluttest auf CMV positiv reagierenden Individuen konnte sein, daß die Virionen, die ursprünglich zur Stimulation eingesetzt worden waren, nicht genügend aufgereinigt waren. Es wurde eine Viruspräparation hergestellt, die über die bisherigen Reinigungsschritte hinaus einer Saccharosegradientenzentrifugation unterworfen wurde. Diese hoch aufgereinigten Virionen wurden im Vollblut-Stimulationstest mit der bisher verwendeten Viruspräparation verglichen. Wie in Tabelle 19 ersichtlich ist, unterschieden sich die Proliferationsergebnisse, die durch die neue Präparation erzielt wurden, nicht signifikant von den bisherigen Werten.

Auch durch die zusätzliche Verwendung eines weiteren CMV-Stammes, CMV Stamm Davis, konnten im Vergleich zu CMV AD 169 keine weiteren positiven Probanden gefunden werden. Individuen, die mit Virionen des Stamms AD169 negativ reagierten, waren es auch mit Virionen des Stammes Davis (Tab. 20).

Schließlich wurden Blutlymphozyten von 4 Spendern in einem Zeitraum von 4 bis 6 Wochen zweimal hinsichtlich ihrer Proliferationsfähigkeit auf CMV getestet. Tabelle 21 zeigt, daß Individuen, die bei der ersten Austestung positiv waren, auch in der zweiten Austestung positiv reagierten.

Zusätzlich wurde von jeder Vollblutprobe die Leukozytenzahl mit Hilfe einer automatischen Zählkammer bestimmt und bei einigen Individuen ein Differentialblutbild angefertigt. Da die Schwankungen der jeweiligen Lymphozytenzahlen

im Normbereich lagen, wurden die Vollblutproben routinemäßig mit Medium RPMI 1640 im Verhältnis 1:15 gemischt. Um dennoch auszuschließen, daß die Werte der Lymphozytenstimulation mit der Anzahl der Blutlymphozyten korrelieren, wurde bei 66 Blutproben ein Vergleich dieser zwei Parameter hinsichtlich des unspezifischen Mitogens PHA gemacht. In Abb. 19 wird gezeigt, daß die Lymphozytenstimulationsfähigkeit der Blutlymphozyten nach Zugabe von PHA unabhängig ist von der Anzahl der weißen Blutzellen und somit die Schwankungen der einzelnen Lymphozytenzahlen vernachlässigt werden können.

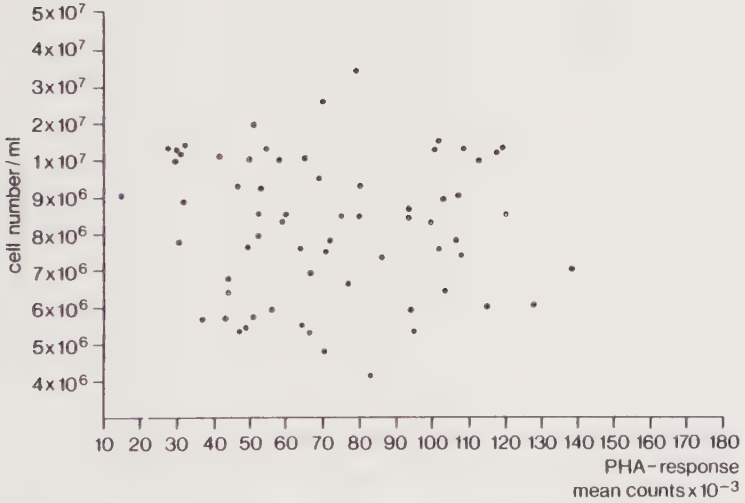


Abb. 19. Korrelation zwischen der Anzahl der weißen Blutzellen in Vollblutproben von 66 Spendern mit der Lymphozytenstimulation nach Zugabe von PHA. Jeder Punkt stellt einen Spender dar.

Tabelle 19. Vergleich der Lymphozytenstimulation in Vollblutkulturen nach Zugabe von CMV Virionen herkömmlicher Aufreinigung und einer über Saccharosegradienten aufgereinigten Viruspräparation (cpm x 10^3).

Anzahl der Spender	Kontrolle	CMV Virionen	aufgereinigte CMV Virionen
1	0.3	0.3	1.3
2	0.9	18.0	25.1
3	0.4	0.2	0.5
4	0.3	0.3	0.2
5	0.4	15.1	18.9
6	0.4	16.1	30.8
7	0.5	0.9	0.3
8	1.6	0.8	1.2
9	0.9	2.2	1.3
10	0.5	0.6	1.6
11	0.8	2.0	0.5
12	1.0	1.5	1.2
13	0.4	14.5	12.8
14	0.2	1.2	0.3
15	0.8	4.3	1.8
16	0.4	5.4	2.4
17	1.0	1.0	1.2
18	1.1	3.8	3.4
19	1.4	0.9	1.3

Tabelle 20. Vergleich der Lymphozytenstimulation in Vollblutkulturen nach Zugabe von CMV Stamm AD 169 und CMV Stamm Davis (cpm x 10^3)

Anzahl der Spender	Kontrolle	CMV AD 169	CMV Davis
1	0.8	2.0	1.3
2	1.0	1.5	1.0
3	0.2	1.2	0.8
4	0.8	4.3	0.4
5	0.4	5.4	2.0
6	0.4	4.3	0.6
7	6.5	0.7	0.4
8	0.4	0.7	0.5
9	2.9	1.4	0.6
10	0.4	0.7	1.5
11	0.5	0.6	0.5
12	0.4	0.8	0.2
13	1.0	0.6	0.6
14	0.5	0.5	0.5
15	0.3	25.6	13.9
16	0.8	8.4	5.4
17	0.5	48.4	22.3
18	0.4	83.5	39.7
19	1.0	98.7	12.7

Tabelle 21. Lymphozytenstimulation in Vollblutkulturen mit 4 CMV positiv reagierenden Spendern bei zweimaliger Austestung (cpm x 10^3)

Spender	Kontrolle	PHA	Con A	CMV AD 169
1	0.7	39.1	43.5	17.3
	0.4	31.5	18.0	5.7
2	2.7	223.4	145.0	72.7
	0.3	49.7	32.8	28.8
3	1.2	80.2	66.2	12.0
	0.4	46.7	62.7	16.1
4	0.2	117.9	78.8	9.2
	0.3	55.2	51.3	5.2

5.2. Untersuchung eines Nabelschnurblutkollektivs

Als weiteres Kontrollkollektiv für die Vollbluttechnik wurden 16 Nabelschnurblutproben hinsichtlich der Lymphozytenstimulation untersucht. Den Vollbluten wurden folgende Stimulantien zugesetzt: drei unspezifische Mitogene (PHA, Con A, PWM), das bakterielle Antigen PPD und zwei virale Antigene HSV und CMV. Wie aus Tab. 22 ersichtlich ist, zeigte sich nur eine geringe Stimulationsfähigkeit der Nabelschnurblutlymphozyten auf die T-Zell-Mitogene PHA und Con A, wohingegen auf PWM gute Ergebnisse erzielt wurden. Wie erwartet wurde gegenüber den viralen Antigenen in keinem Fall eine spezifische Lymphozytenreaktion beobachtet.

5.3. Untersuchung von Säuglingen

Die untersuchten Blutproben wurden von sieben Säuglingen im Alter zwischen 2 und 18 Wochen erhalten. Jede Probe bestand aus 1 ml heparinisiertem Vollblut, das mit Medium RPMI 1640 im Verhältnis 1:15 gemischt wurde. Auch hier wurden als Stimulantien die drei unspezifischen Mitogene PHA, Con A und PWM eingesetzt, sowie das bakterielle Antigen PPD und die zwei viralen Antigene HSV und CMV. Alle sieben Blutproben zeigten auf die unspezifischen Mitogene eine insgesamt gute zelluläre Reaktion; auf PPD reagierten drei Säuglinge positiv. Mit den beiden viralen Antigenen wurde in keinem Fall eine positive Stimulation erreicht (Tab. 23).

Tabelle 22. Lymphozytenstimulation in Nabelschnurblutproben (cpm x 10^3)

Anzahl der Spender	Kontrolle	PHA	Con A	PWM	PPD	HSV-1	CMV
1	0.8	7.2	2.8	23.3	3.2	1.9	1.0
2	1.1	1.5	1.8	4.1	1.5	1.2	1.6
3	1.8	2.9	1.8	16.0	2.0	1.0	1.3
4	3.0	10.8	4.5	22.5	3.0	3.3	2.1
5	3.0	4.4	5.7	25.4	2.8	2.7	2.6
6	1.0	2.4	3.9	8.9	1.1	0.6	0.8
7	1.5	3.4	4.7	14.9	3.0	2.4	1.9
8	0.9	4.5	8.0	10.4	3.5	3.9	2.5
9	2.4	3.8	4.9	36.4	2.2	1.2	1.4
10	1.1	3.3	5.8	49.6		1.1	0.5
11	3.7	8.2	6.1	17.6		5.5	5.0
12	3.3	6.7	5.5	15.9		2.6	1.4
13	0.6	5.2	3.4	54.6		0.6	0.8
14	1.3	8.8	4.5	9.6		2.2	2.6
15	4.3	6.4	5.4	12.0		1.3	0.9
16	1.0	4.0	2.8	12.5		1.3	2.0

Tabelle 23. Lymphozytenstimulation in Vollblutkulturen von Säuglingen (cpm x 10^3)

Spender	Kontrolle	PHA	Con A	PWM	PPD	HSV	CMV
1	0.5	10.7	6.9	10.9	3.8	0.5	0.2
2	0.2	10.9	2.5	12.1	0.5	0.2	0.4
3	0.3	28.8	10.2	10.1	1.7	0.8	0.7
4	0.3	7.5	2.5	1.1	1.9	0.9	1.3
5	1.5	35.7	6.2	145.1	4.7	1.7	1.0
6	1.1	19.5	5.7	167.7	4.0	1.4	1.3
7	1.5	3.7	5.1	15.3	2.3	1.3	0.9

6. Untersuchungen von Patientenkollektiven

6.1. Untersuchung von Patienten mit Herzoperationen

Bei dieser Patientengruppe handelte es sich um 45 Patienten, die am offenen Herzen operiert wurden. Bei dieser Studie sollte mit Hilfe der Vollbluttechnik die Lymphoproliferationsfähigkeit der Blutlymphoyzten auf verschiedene Mitogene und Antigene untersucht werden. Den Patienten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten für die Studie Blutproben entnommen. Alle 45 Patienten wurden vor der Operation, 31 von ihnen eine Woche nach der Operation und 18 von ihnen zwei Wochen nach der Operation untersucht. In Tabelle 24 sind 10 von 18 Patienten aufgeführt, deren Blutproben dreimalig ausgetestet worden waren. Folgende Stimulantien wurden eingesetzt: drei unspezifische Mitogene, PHA, Con A und PWM, das bakterielle Recall-Antigen Tuberculin PPD und das virale Antigen HSV.

Die Patientengruppe wurde mit einer Kontrollgruppe, die aus 45 gesunden erwachsenen Blutspendern bestand, verglichen. Abb. 20 zeigt den Vergleich der Lymphoproliferationswerte der Blutlymphozyten von Kontrollen und Herzpatienten präoperativ. Vor der Operation konnte zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Lymphoproliferation auf Mitogene und Antigene festgestellt werden. Die Lymphozyten aller ausgetesteten Personen, Patienten wie Kontrollen, reagierten auf die Mitogene PHA, Con A und PWM mit hohen Stimulationswerten. In den meisten Fällen wurde auch gegenüber dem bakteriellen Antigen PPD und dem viralen Antigen HSV eine klare lymphozytäre Antwort aufgezeigt. In beiden Gruppen lagen die Proliferationswerte in einer Höhe, wie sie bei bisherigen Untersuchungen gefunden wurde.

Tabelle 24. Messung der Lymphoproliferation (cpm x 10^3) in Vollblutkulturen von 10 von 18 Herzpatienten vor und nach der Operation

Patient	Zeitpunkt der Untersuchung	Kontrolle	PHA	Con A	PWM	PPD	HSV
1	I[a]	0.8	116.7	34.3	96.3	106.5	26.1
	II[b]	1.7	7.4	2.9	49.1	31.2	2.5
	III[c]	1.9	20.8	2.5	46.0	17.6	3.3
2	I	0.4	108.9	22.1	55.8	28.6	20.5
	II	1.4	5.9	1.8	58.0	1.8	7.7
	III	2.3	95.8	3.2	84.1	4.0	10.7
3	I	0.3	129.2	35.4	41.7	72.7	3.8
	II	2.1	58.1	18.8	50.3	24.0	6.3
	III	1.8	93.4	22.1	37.5	43.5	3.2
4	I	1.1	46.3	33.3	71.6	51.5	32.0
	II	0.3	1.9	0.2	9.8	0.2	1.7
	III	0.6	9.4	3.0	17.7	2.7	7.1
5	I	0.3	80.5	53.6	100.5	87.5	20.8
	II	0.3	72.4	17.3	44.1	6.9	5.2
	III	0.7	30.4	1.8	58.6	16.0	1.9
6	I	0.5	82.7	49.0	122.4	80.1	28.9
	II	1.2	8.9	3.9	57.6	2.0	4.5
	III	0.4	54.6	15.9	67.8	0.4	0.4
7	I	1.5	84.6	59.4	131.3	84.0	30.1
	II	0.4	17.4	2.5	22.6	6.1	4.2
	III	0.7	21.5	3.9	28.1	30.8	3.1
8	I	2.5	57.7	77.3	27.2	2.6	4.3
	II	0.8	11.4	4.2	38.8	2.0	0.8
	III	0.4	106.6	82.4	5.2	9.8	1.4
9	I	1.1	99.2	34.1	90.2	17.2	6.3
	II	0.7	11.4	4.2	38.8	2.0	0.8
	III	1.1	38.0	21.9	60.3	58.9	1.1
10	I	0.6	18.5	26.3	98.2	64.8	14.8
	II	0.7	13.4	0.8	16.0	14.9	2.4
	III	0.6	15.9	2.1	53.1	29.6	4.4

a präoperativ
b 1 Woche nach Operation
c 2 Wochen nach Operation

Eine Woche nach der Operation wurde gegenüber allen Stimulantien eine signifikante Erniedrigung der Lymphozytenreaktion gefunden mit einem Signifikanzniveau, das bei 0,01 festgelegt worden war (Abb. 21). Wenn z.B. auf Stimulation mit PHA vor der Operation ein Medianwert von 80 500 cpm gefunden wurde, so betrug er nach der Operation nur noch 18 800 cpm. Eine ähnlich starke Abnahme der Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten wurde auch bezüglich der anderen Stimulantien beobachtet. Zwei Wochen nach der Operation zeichnete sich kein signifikanter Unterschied zu den 1-Wochen-Stimulationswerten ab (Abb. 22). Es war mit keinem der im Test eingesetzten Stimulantien eine Steigerung der Proliferationsrate zu erreichen. Bei Betrachtung der Medianwerte zeigte sich allerdings ein leichter Anstieg der zellulären Stimulation. Wenn man, wie in Abb. 23dargestellt ist, die Proliferationswerte vor der Operation mit denen zwei Wochen nach der Operation hinsichtlich der beiden Antigene PPD und HSV vergleicht, wurde kein signifikanter Unterschied gefunden. Bezüglich der Mitogene allerdings wurde ein signifikanter Unterschied der Werte in dem oben genannten Zeitraum gemessen, für PHA und PWM erreichten die Stimulationswerte den statistischen p-Wert von 0,01.

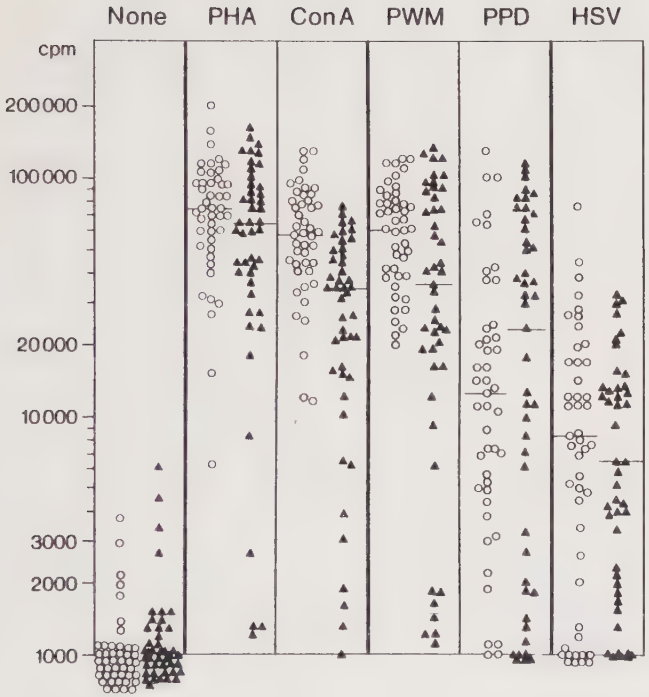


Abb. 20. Vergleich der Lymphoproliferation in Vollblutkulturen von Kontrollpersonen (O) und Herzpatienten vor der Operation (▲). Die waagrechte Linie stellt den Medianwert dar.

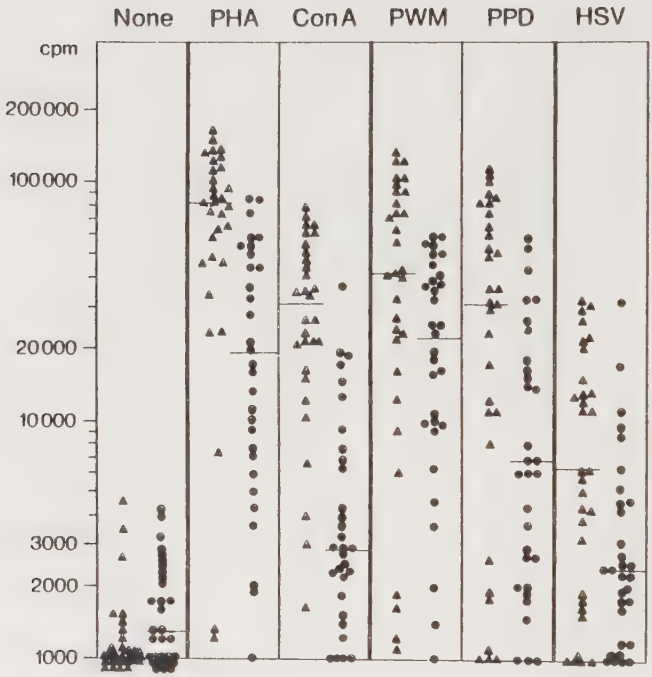


Abb. 21. Vergleich der Lymphoproliferation in Vollblutkulturen von Herzpatienten vor der Operation (▲) und 1 Woche nach der Operation (●). Die waagrechte Linie stellt den Medianwert dar.

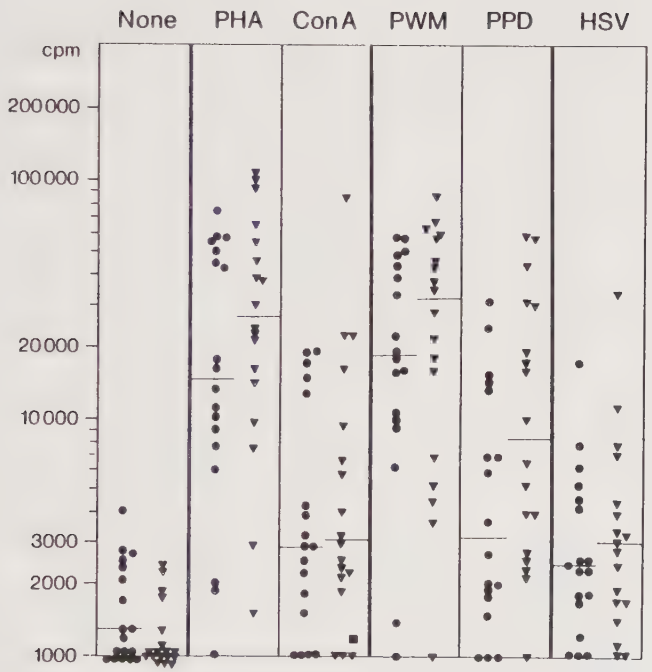


Abb. 22. Vergleich der Lymphoproliferation in Vollblutkulturen von Herzpatienten 1 Woche nach der Operation (●) und 2 Wochen nach der Operation (▼). Die waagrechte Linie stellt den Medianwert dar.

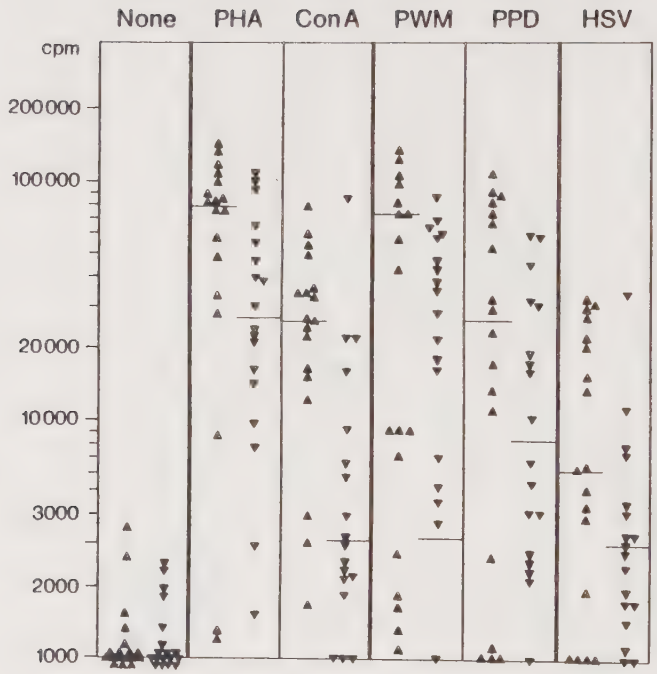


Abb. 23. Vergleich der Lymphoproliferation in Vollblutkulturen von Herzpatienten vor der Operation (▲) und 2 Wochen nach der Operation (▼). Die waagrechte Linie stellt den Medianwert dar.

6.2. Untersuchung von männlichen Homosexuellen mit Lymphadenopathie-Syndrom

Diese Gruppe bestand aus 32 männlichen Homosexuellen, bei denen ein Lymphadenopathie-Syndrom festgestellt worden war. Sie wurden mit der Vollblut-technik hinsichtlich ihrer Lymphoproliferationsfähigkeit auf zwei unspezifische Mitogene PHA und PWM und auf ein virales Antigen, CMV untersucht. Als Kontroll-kollektiv dienten 29 gesunde erwachsene Blutspender. Bei beiden Gruppen wurden mittels der ELISA-Technik Serum-Antikörper gegen CMV bestimmt. Die Blut-lymphozyten aller Kontrollpersonen reagierten auf die Mitogene mit sehr guten Stimulationswerten, wogegen auf CMV 66 Prozent der gesunden Spender positive Proliferationsergebnisse aufwiesen (Tab. 25). Die Gruppe der homosexuellen Patien-ten reagierte auf alle Stimulantien mit erhöhten Stimulationswerten. Das Signi-fikanzniveau wurde für PHA auf $p = 0{,}024$, für PWM auf $p = 0{,}5$ und für CMV auf $p = 0{,}002$ festgelegt. Auch die Anzahl der Personen, die auf CMV positiv reagierten, war mit 84 Prozent in der Patientengruppe höher als in der Kontroll-gruppe (Tab. 26).

Für beide Gruppen wurden Serum-Antikörper gegen CMV bestimmt. In der Kontrollgruppe besaßen nur 8 Individuen, das entspricht 30%, Antikörper gegen CMV, wogegen in der Patientengruppe alle Homosexuellen serologisch positiv waren (Tab. 25, Tab. 26).

Tabelle 25. Lymphoproliferation (cpm x 10^3) in Vollblutkulturen von gesunden Kontrollpersonen (Kontrollkollektiv zu Tab. 26)

Spender	Kontrolle	PHA	PWM	CMV	SD*
1	1,1	135	89	3	-
2	1,4	100	26	2	-
3	2,1	104	84	5	+
4	2,9	154	39	78	+
5	5,4	182	78	16	-
6	1,0	105	39	11	+
7	0,4	94	22	1	
8	6,4	404	96	48	
9	3,3	167	90	17	-
10	3,6	143	62	32	-
11	9,0	110	27	7	-
12	2,0	159	59	8	-
13	1,0	30	9	3	+
14	0,9	88	67	2	-
15	3,4	59	19	5	-
16	1,4	15	32	12	-
17	0,8	78	63	2	-
18	1,0	152	63	23	-
19	3,5	118	95	10	-
20	3,7	151	105	12	-
21	0,6	81	31	10	+
23	2,4	154	46	11	-
24	1,3	34	10	2	+
25	1,4	135	46	17	+
26	0,3	90	41	6	-
27	2,0	258	64	12	-
28	1,2	72	33	6	-
29	7,0	81	24	29	+

* Serologische Daten: IgG

Tabelle 26. Lymphoproliferation (cpm x 10^3) in Vollblutkulturen von männlichen Homosexuellen mit Lymphadenopathie-Syndrom

Patient	Kontrolle	PHA	PWM	CMV	SD*
1	1,2	32	4	4	+
2	5,3	177	33	36	+
3	3,3	118	34	43	+
4	2,1	147	43	28	+
5	3,3	115	15	5	+
6	2,0	192	53	17	+
7	6,0	87	7	18	+
8	7,0	390	171	53	+
9	2,0	320	140	15	+
10	3,8	102	23	7	+
11	1,2	70	24	5	+
12	3,0	85	13	15	+
13	1,8	205	28	10	+
14	1,2	140	16	25	+
15	7,0	295	81	47	+
16	4,0	242	47	15	+
17	4,4	351	97	4	+
18	5,4	273	121	77	+
19	3,0	223	101	30	+
20	4,0	285	147	26	+
21	3,0	168	55	159	+
22	3,6	183	35	2	+
23	3,2	83	18	31	+
24	5,0	120	105	21	+
25	2,1	57	20	6	+
26	3,0	66	19	38	+
27	3,2	68	25	9	+
28	1,4	104	45	24	+
29	3,2	218	184	80	+
30	5,0	364	211	19	+
31	1,7	159	60	5	+
32	1,2	145	45	28	+

* Serologische Daten: IgG

Diese Homosexuellen mit Lymphadenopathie-Syndrom wurden mit einer gesunden Kontrollgruppe (Tab. 25) hinsichtlich der zellulären Immunkapazität verglichen. Die Patienten reagierten auf alle Stimulantien mit erhöhten Stimulationswerten. Das Signifikanzniveau lag für PHA bei $p = 0{,}024$, für PWM bei $p = 0{,}5$ und für CMV bei $p = 0{,}002$. Die statistische Analyse wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt.

Bezüglich der homosexuellen Patienten konnte zwischen der zellulären Immunität und der Serologie eine gute Korrelation aufgezeigt werden (Tab. 27). Alle Patienten mit Lymphadenopathie-Syndrom hatten Antikörper gegen CMV und 27 von ihnen waren auf CMV positiv im Lymphozytenstimulationstest. Kein Patient reagierte in einem der beiden Tests negativ. In der Kontrollgruppe hingegen konnte keine Korrelation zwischen zellulärer und humoraler Immunität gefunden werden (Tab. 28). Im Proliferationstest zeigten 6 von 8 serologisch positive Personen ebenfalls positive Reaktion, aber nur 7 von 19 seronegativen Individuen waren auch in der Proliferation negativ. Bei zwei Kontrollpersonen konnte kein Antikörpertest durchgeführt werden, da mangels Blutmaterial kein Serum gewonnen werden konnte.

Tabelle 27. Korrelation der Serologie mit den Lymphoproliferationswerten in der Patientengruppe bezüglich CMV (Anzahl der Patienten)

		Serologie	
		positiv	negativ
Lymphoproliferationstest	positiv	27	0
	negativ	5	0

Tabelle 28. Korrelation der Serologie mit den Lymphoproliferationswerten in der Kontrollgruppe bezüglich CMV (Anzahl der Spender)

		Serologie	
		positiv	negativ
Lymphoproliferationstest	positiv	6	12
	negativ	2	7

Zusätzlich zur homosexuellen Patientengruppe wurde die zelluläre Immunität von 15 männlichen Homosexuellen untersucht, die symptomfrei waren und zu Routineuntersuchungen in die sogenannte STD (sexual transmitted diseases)-Sprechstunde der Hautklinik Heidelberg kamen. Als Kontrollgruppe dienten 15 gesunde erwachsene Blutspender. Es wurden folgende Stimulantien ausgetestet: drei Mitogene (PHA, Con A, PWM), ein bakterielles Antigen (PPD) und zwei virale Antigene (HSV, CMV).

Auf Stimulation mit PHA, Con A, PPD und den zwei viralen Antigenen HSV und CMV konnte kein Unterschied der Proliferationswerte zwischen den Kontrollpersonen und diesen männlichen Homosexuellen gefunden werden. Lediglich auf Stimulation mit dem Mitogen PWM zeigten sich bei einem Signifikanzniveau von $p = 0{,}01$ signifikant erniedrigte Stimulationswerte bei den Homosexuellen; auch der Medianwert der Proliferationsdaten lag mit 25,7 cpm bei der Patientengruppe bezüglich PWM wesentlich niedriger als bei den Normalpersonen, hier betrug er 76,4 cpm (Abb. 24). Auch hier wurden bei beiden Gruppen Serum-Antikörper gegen HSV und CMV mittels ELISA-Test bestimmt (Tab. 29, Tab. 30).

HSV betreffend wurde bei der Kontrollgruppe eine klare Korrelation zwischen zellulärer und humoraler Immunität aufgezeigt (Tab. 31); bei den Homosexuellen stimmten bei 13 von 15 Personen beide Tests überein (Tab. 32). CMV betreffend wurde nur bei den Kontrollpersonen eine weitgehende Korrelation zwischen Serologie und Lymphoproliferation gefunden (Tab. 33). Bei 13 Blutspendern wurden sich entsprechende Ergebnisse erzielt; bei den Homosexuellen dagegen nur bei 5 Personen (Tab. 34).

Tabelle 29. Lymphoproliferation (cpm x 10^3) in Vollblutkulturen von gesunden Kontrollpersonen (Kontrollkollektiv zu Tab. 30).

Spender	Kontrolle	PHA	Con A	PWM	PPD	HSV	SD*	CMV	SD*
1	0,7	138,2	76,8	79,6	130,7	24,2	+	35,7	+
2	1,4	86,2	78,4	113,4	7,2	19,5	+	3,2	+
3	0,7	72,2	50,8	100,5	16,3	17,4	+	5,9	+
4	0,5	57,5	42,5	41,8	0,8	18,7	+	0,2	-
5	0,3	30,1	57,8	73,5	1,1	0,2	-	0,2	-
6	0,7	50,8	67,0	1,6	1,7	0,8	-	1,1	-
7	1,0	79,8	78,6	79,3	3,1	17,3	+	1,5	+
8	1,8	113,1	79,3	71,7	14,1	5,4	+	3,2	+
9	1,0	77,6	34,8	35,5	0,9	5,1	+	0,3	-
10	0,8	40,8	52,8	23,4	64,8	5,2	+	13,0	+
11	0,5	94,9	98,2	82,9	5,2	0,4	-	1,5	-
12	0,4	118,0	87,1	27,8	5,0	11,9	+	13,3	-
13	3,0	74,3	40,8	116,3	18,6	38,4	+	1,2	-
14	0,8	62,3	26,1	111,0	54,0	0,5	-	0,3	-
15	0,7	39,1	52,8	110,8	6,5	32,8	+	1,3	-

* Serologische Daten: IgG

Tabelle 30. Lymphoproliferation (cpm x 10^3) in Vollblutkulturen von symptomfreien männlichen Homosexuellen

Spender	Kontrolle	PHA	Con A	PWM	PPD	HSV	SD*	CMV	SD*
1	0,1	107,8	48,4	62,8	1,0	6,1	+	7,9	+
2	0,1	55,0	1,6	0,6	0,3	23,8	+	0,1	+
3	0,9	25,6	19,0	2,3	1,2	16,3	+	1,7	+
4	0,2	30,2	31,3	24,4	0,9	13,3	+	0,5	+
5	0,6	147,4	122,1	93,7	81,5	35,8	+	3,9	+
6	7,2	97,0	46,5	25,7	9,4	50,3	+	12,1	+
7	0,2	91,6	117,3	93,3	3,7	16,2	+	1,4	+
8	0,5	92,0	41,6	5,2	1,4	13,7	+	2,5	+
9	0,3	54,3	48,6	54,3	20,1	5,2	+	0,4	-
10	0,2	169,6	70,0	49,8	4,2	63,3	+	0,4	+
11	0,4	48,4	2,8	20,4	0,7	4,6	+	1,5	+
12	0,2	104,5	50,7	58,1	6,1	1,3	+	2,9	+
13	0,2	104,5	50,7	58,1	6,1	1,3	+	2,9	+
14	0,4	19,6	17,1	1,5	1,5	1,3	+	1,3	+
15	1,6	64,0	19,6	14,0	3,7	16,9	+	1,8	+

* Serologische Daten: IgG

15 symptomfreie Homosexuelle wurden mit einer gesunden Kontrollgruppe (Tab. 29) verglichen. Auf Stimulation mit PWM zeigte sich bei den Homosexuellen bei einem Signifikanzniveau von p = 0,01 eine signifikant erniedrigte Stimulation. Nach Zugabe der anderen Stimulantien konnten zwischen Kontrollen und Homosexuellen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die statistische Analyse wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt.

Tabelle 31. Korrelation des Antikörperstatus mit der Lymphoproliferation bei 15 gesunden Erwachsenen bezüglich HSV (Anzahl der Spender)

		Serologie	
		positiv	negativ
Lymphoproliferationstest	positiv	11	0
	negativ	0	4

Tabelle 32. Korrelation des Antikörperstatus mit der Lymphoproliferation bei 15 symptomfreien männlichen Homosexuellen bezüglich HSV (Anzahl der Spender)

		Serologie	
		positiv	negativ
Lymphoproliferationstest	positiv	13	0
	negativ	2	0

Tabelle 33. Korrelation des Antikörperstatus mit der Lymphoproliferation bei 15 gesunden Erwachsenen bezüglich CMV (Anzahl der Spender)

		Serologie	
		positiv	negativ
Lympoproliferationstest	positiv	5	1
	negativ	1	8

Tabelle 34. Korrelation des Antikörperstatus mit der Lymphoproliferation bei 15 symptomfreien männlichen Homosexuellen bezüglich CMV (Anzahl der Spender)

		Serologie	
		positiv	negativ
Lymphoproliferationstest	positiv	4	0
	negativ	10	1

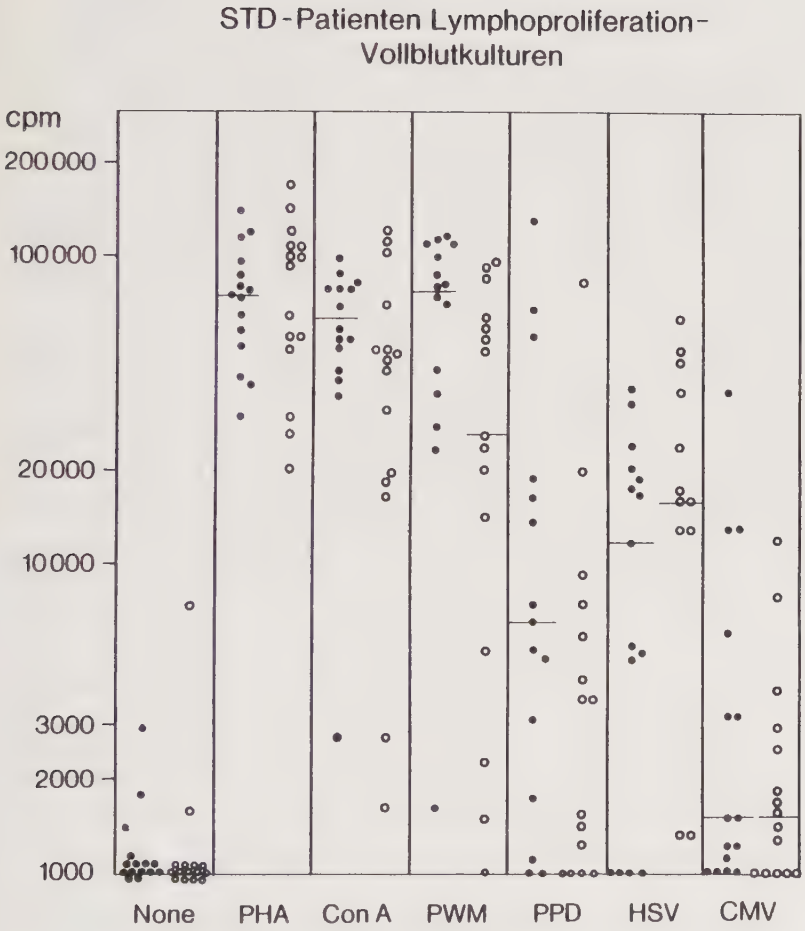


Abb. 24. Vergleich der Lymphoproliferation in Vollblutkulturen von gesunden Kontrollpersonen (●) und symptomfreien männlichen Homosexuellen

6.3. Untersuchung der Lymphoproliferation in Vollblutkulturen von Kolonkarzinom-Patienten prä- und postoperativ

Patienten, die an malignen Tumoren erkrankt sind, z.B. Kolonkarzinom-Patienten, weisen oft Störungen der zellulären Immunantwort auf (Hilal et al., 1977; Wanebo et al., 1980; Doldi et al., 1984). In dieser Studie sollten mit der Vollbluttechnik die T-Zellfunktionen bei Kolonkarzinom-Patienten untersucht werden. Bei 108 Patienten, die sich einer Operation zu unterziehen hatten, wurde der Status der zellulären Immunität präoperativ, bei 50 Patienten 10 Tage nach der Operation und bei 35 Patienten 3 Monate nach der chirurgischen Resektion bestimmt. Die Kontrolle bestand aus 33 gesunden erwachsenen Blutspendern in der gleichen Altersverteilung wie die Patientengruppe. Im Vollbluttest wurde die Lymphoproliferation auf folgende Stimulantien gemessen: 3 Mitogene (PHA, Con A, PWM), ein T-Zell-Antikörper (OKT 3) und ein bakterielles Antigen (Tuberculin PPD). Die Ergebnisse zeigten, daß die Blutleukozyten von Kolonkarzinompatienten und von Normalpersonen auf Mitogene eine unterschiedliche Reaktion aufwiesen. Bei einem Signifikanzniveau von p 0,001 ergaben sich signifikant erniedrigte Werte bei Kolonkarzinom-Patienten vor der Operation und 10 Tage nach der Operation auf PHA, Con A und OKT 3 (Abb. 25). Diese Unterschiede waren unabhängig vom jeweiligen Tumorstadium gefunden worden. Die Stimulationswerte auf PWM waren ebenfalls signifikant erniedrigt (Abb. 26). Bezüglich PHA, Con A und OKT 3 lagen auch die Medianwerte bei den Stimulationswerten 10 Tage nach der Operation niedriger als vor der Operation. Nach Stimulation mit dem bakteriellen Antigen PPD waren jedoch bei Kontrollen wie bei Patienten Proliferationswerte in ähnlicher Höhe zu verzeichnen (Abb. 26).

Bei 35 Kolonkarzinom-Patienten wurde die mitogen- und antigeninduzierte Lymphoproliferation zu drei verschiedenen Zeitpunkten gemessen: vor der Opera-

tion, 10 Tage nach der Operation und 3 Monate nach der Operation. Drei Monate nach der chirurgischen Resektion konnten im Vergleich zu den Werten, die 10 Tage postoperativ erhalten wurden, erhöhte Stimulationswerte beobachtet werden; bezüglich PHA, Con A, OKT 3 und PPD war kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen feststellbar (Abb. 27,28). Auch die Antwort auf PWM war 3 Monate nach der Operation wieder angestiegen, doch hier wurde noch ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten gemessen (Abb. 28). Insgesamt konnte gezeigt werden, daß in 80 Prozent der Fälle ein Defekt in der Proliferationsantwort bei Kolonkarzinom-Patienten 3 Monate nach der Operation zu einem Großteil normalisiert wurde.

Bei 25 Kolonkarzinom-Patienten wurde zusätzlich mit Hilfe der Vollblutmethode die zelluläre Immunreaktion auf CMV und HSV bestimmt. In der spezifischen zellulären Immunantwort auf CMV zeigten sich keine Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Dagegen reagierten auf HSV von 33 Kontrollpersonen 23 mit positiver Stimulation, während nur 6 Karzinompatienten eine HSV-positive Lymphoproliferation zeigten.

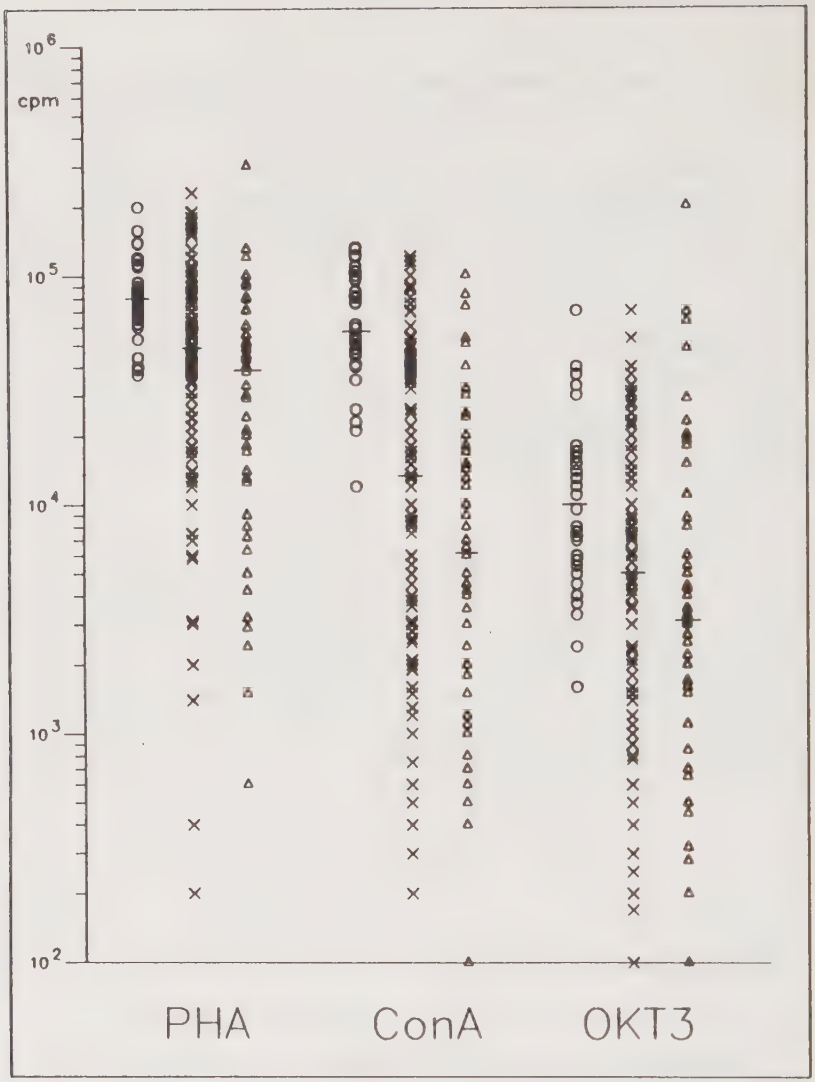


Abb. 25. Lymphoproliferation von Kontrollpersonen und Kolonkarzinom-Patienten nach Stimulation mit verschiedenen Mitogenen vor der Operation und 10 Tage nach der Operation.

O Kontrollpersonen	n = 33
x Patienten präoperativ	n = 108
Δ Patienten 10 Tage postoperativ	n = 60

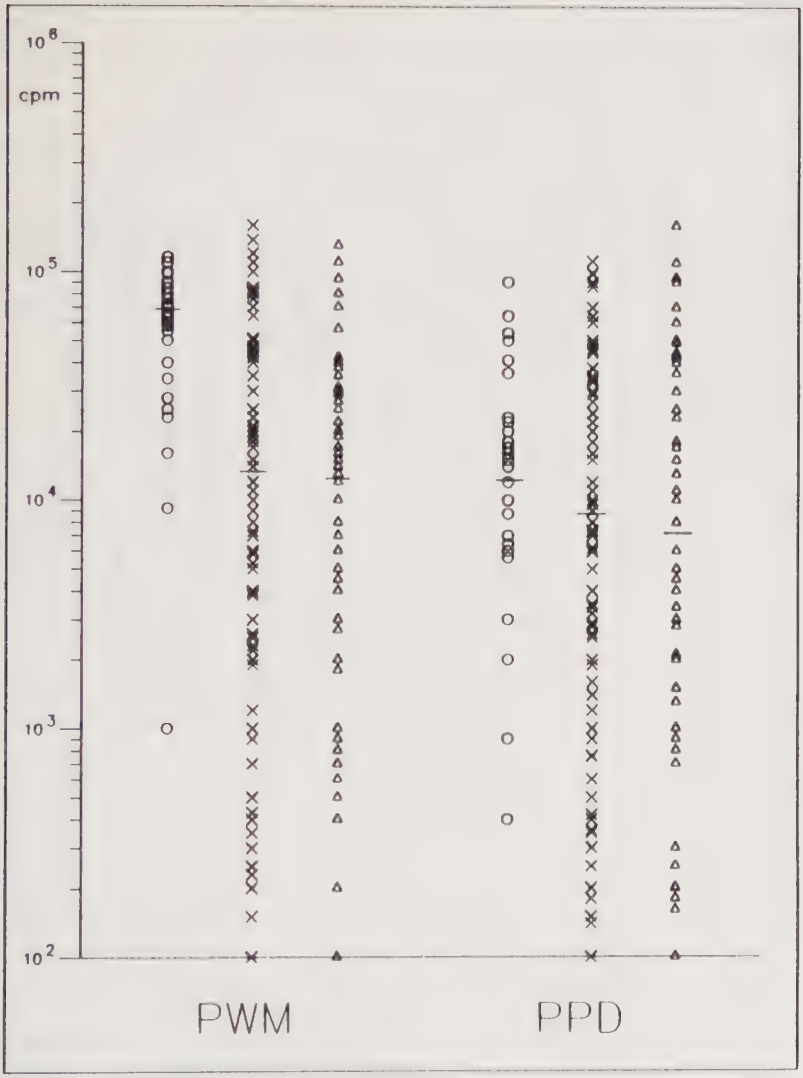


Abb. 26. Lymphoproliferation von Kontrollpersonen und Kolonkarzinom-Patienten nach Stimulation mit einem Mitogen und einem bakteriellen Recall-Antigen vor der Operation und 10 Tage nach der Operation.

O Kontrollpersonen	n = 33
x Patienten präoperativ	n = 108
Δ Patienten 10 Tage postoperativ	n = 60

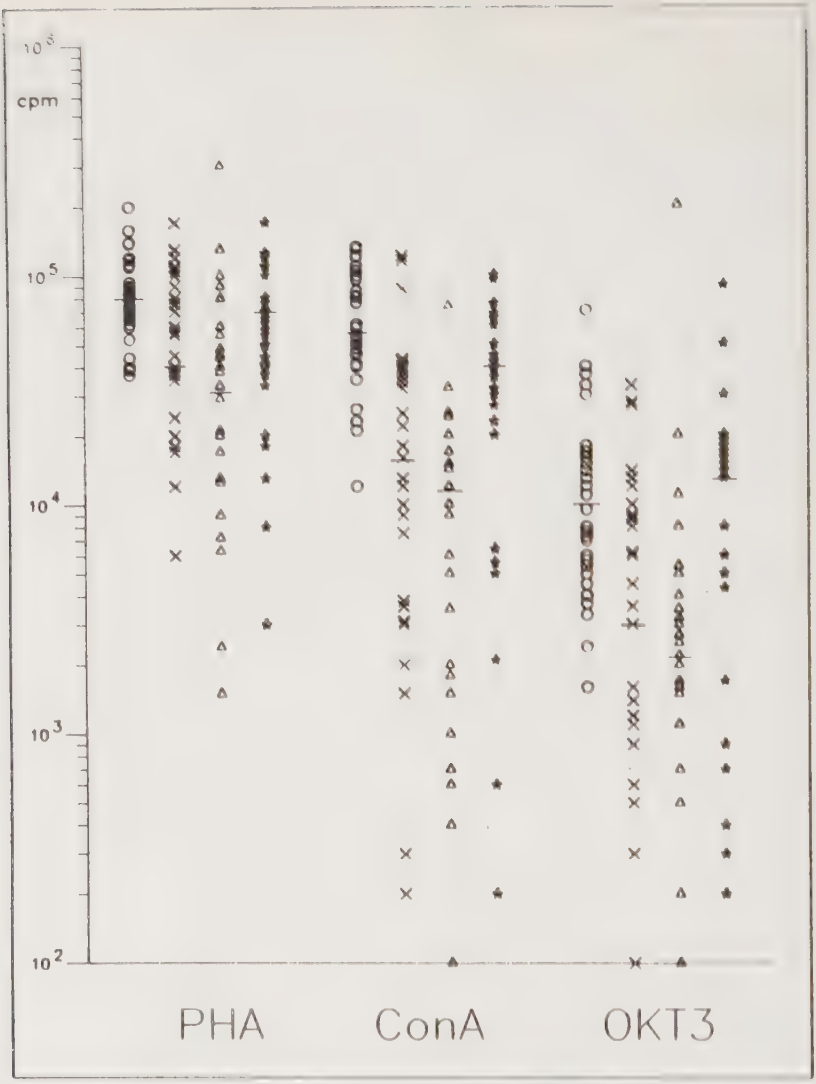


Abb. 27. Lymphoproliferation von Kontrollpersonen und Kolonkarzinom-Patienten nach Stimulation mit verschiedenen Mitogenen vor der Operation und nach der Operation.

O Kontrollpersonen	n = 33
x Patienten präoperativ	n = 35
Δ Patienten 10 Tage postoperativ	n = 35
✱ Patienten 3 Monate postoperativ	n = 35

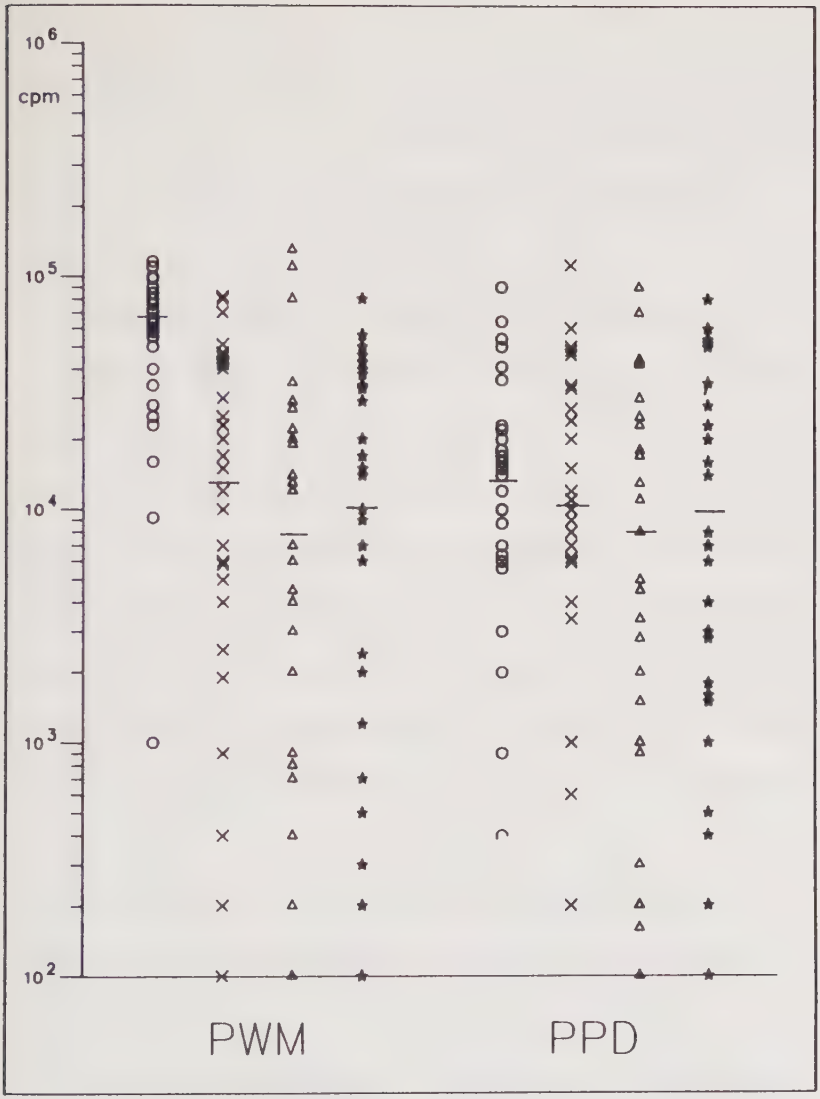


Abb. 28. Lymphoproliferation von Kontrollpersonen und Kolonkarzinom-Patienten nach Stimulation mit einem Mitogen und einem bakteriellen Recall-Antigen vor der Operation und nach der Operation.

O Kontrollpersonen	n = 33
X Patienten präoperativ	n = 35
Δ Patienten 10 Tage postoperativ	n = 35
✱ Patienten 3 Monate postoperativ	n = 35

6.4. Untersuchung der Lymphoproliferation und Interferonproduktion im Vollblut von Schizophreniepatienten

In Vollblutkulturen von Schizophreniepatienten und Kontrollpersonen wurde die mitogen- und antigeninduzierte Lymphoproliferation und die Interferonproduktion untersucht. Für die Lymphoproliferation und die Bestimmung des Seruminterferons standen 30 Patienten und 30 Kontrollen zur Verfügung, für Untersuchungen der Interferonproduktion wurden 19 Patienten und 12 Kontrollen ausgetestet. Folgende Stimulantien wurden verwendet: die Mitogene PHA, Con A, PWM, die bakteriellen Antigene Tuberculin PPD und Corynebacterium parvum (CP) und die viralen Antigene HSV, CMV und NDV. Die Ergebnisse der Lymphoproliferationsversuche sind in Tab. 35 und Tab. 36 aufgeführt. Tab. 35 zeigt die Proliferationsdaten aus Leukozytenkulturen von Kontrollpersonen, während in Tab. 36 die Daten der Schizophreniepatienten aufgeführt sind. Die Lymphozyten der gesunden Personen zeigten auf alle Mitogene eine hohe Reaktivität. Die meisten Kontrollpersonen reagierten auch auf PPD und HSV, während nur eine geringe Anzahl von Blutproben auch auf CMV positive Stimulationsergebnisse zeigten (Tab. 35, Abb. 29). Der Vergleich der Lymphoproliferationsdaten von Kontrollpersonen und Schizophreniepatienten zeigte bezüglich den T-Zellmitogenen PHA und Con A Unterschiede auf. In der Patientengruppe wurden bei einem Signifikanzniveau von $p = 0{,}01$ signifikant erniedrigte Stimulationswerte auf beide Mitogene gemessen. Mit PWM ließen sich die Leukozyten von schizophrenen und normalen Blutspendern in gleichem Umfang stimulieren; es wurde ebenfalls kein Unterschied in den Reaktionen auf PPD, HSV und CMV beobachtet (Tab. 36, Abb. 29). Desgleichen war die Anzahl der Personen, die auf HSV oder CMV positiv reagierten, im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Patientengruppe nicht erhöht (Abb. 29). In der zellulären spezifischen Immunreaktion auf HSV zeigten 16 Blutproben von Schizo-

phreniepatienten eine signifikante Lymphoproliferation (> 4000 cpm), wogegen auf CMV nur 9 Proben positiv reagierten. Auch die Medianwerte der Lymphoproliferationsdaten waren in der Patientengruppe nicht signifikant erhöht (Tab. 35, Tab. 36).

Für beide Personengruppen wurden mit der ELISA-Technik IgG-Antikörper gegen HSV und CMV bestimmt. In der Patientengruppe wurde bezüglich HSV in den meisten Fällen eine Übereinstimmung zwischen humoraler und zellulärer Immunität gefunden (Tab. 37). So waren 13 von 14 im Proliferationstest negative Patienten auch in der Serologie negativ, wogegen 16 von 17 seropositiven Schizophrenen auch in der zellulären Immunität positiv waren. In der Kontrollgruppe zeigten 20 HSV-IgG positive Personen auch im Proliferationstest auf HSV positive Werte auf, aber nur 8 von 10 in der Lymphoproliferation negative Individuen waren ebenfalls seronegativ. Bezüglich CMV wurde in der Patientengruppe nur eine geringe Korrelation zwischen zellulärer und humoraler Immunität gefunden (Tab. 38). Nur 4 der 30 Schizophrenen waren im Antikörpertest positiv, im Proliferationstest waren es 9 Patienten. Die Mehrzahl der Seronegativen war in der zellulären Immunität ebenfalls negativ. In der Kontrollgruppe hingegen wurde eine gute Korrelation zwischen Serologie und Proliferation gefunden.

Schießlich wurden bei 19 Schizophrenen und 12 Kontrollen die in vitro Induktion von Interferon auf verschiedene Stimulantien getestet (Abb. 30). Schizophreniepatienten und Kontrollpersonen unterschieden sich signifikant in der Fähigkeit zur IFN-Produktion. Leukozyten von Schizophrenen produzierten weniger IFN als Kulturen der normalen Blutspender nach Stimulation mit den Induzenten von gamma-Interferon, PHA und Con A. Nach Stimulation mit den alpha-Interferon-induzenten NDV und CP zeigten Leukozyten Schizophrener ebenfalls eine signifikant reduzierte Fähigkeit der Interferonproduktion. Für Con A, NDV und CP betrug der statistische p-Wert 0,01, für PHA war p = 0,053.

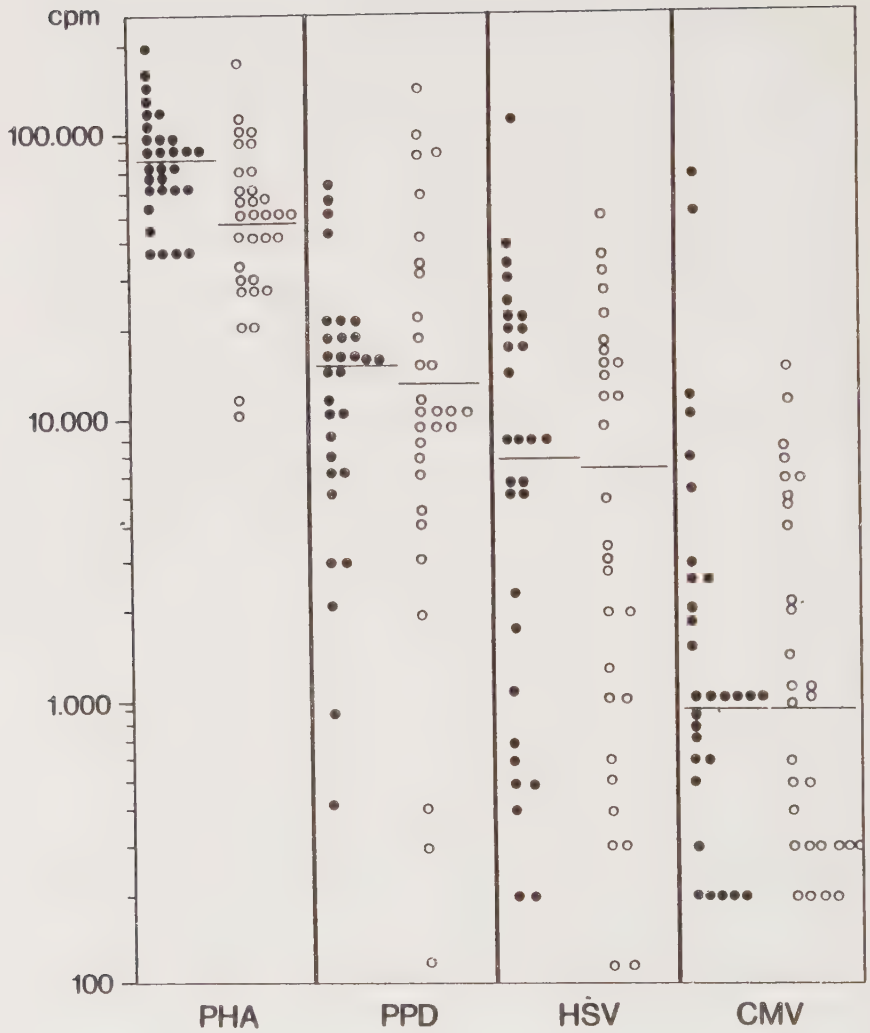


Abb. 29. Lymphoproliferation von Kontrollpersonen und Schizophreniepatienten nach Stimulation mit einem Mitogen und verschiedenen Antigenen.

● Kontrollpersonen
○ Schizophreniepatienten
— Medianwert

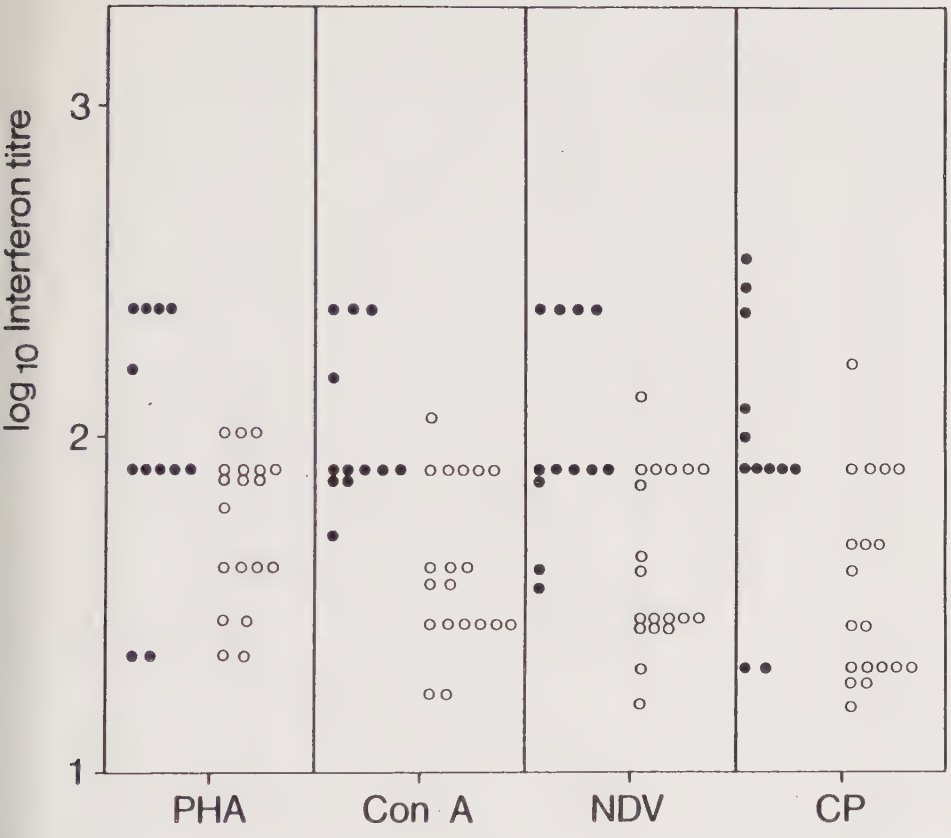


Abb. 30. Interferonproduktion von Kontrollpersonen und Schizophreniepatienten nach Stimulation mit PHA, Con A, C. parvum und NDV.

● Kontrollpersonen (n = 12)

O Schizophreniepatienten (n = 19)

Tabelle 35. Lymphoproliferation (cpm x 10^3) in Vollblutkulturen von Kontrollpersonen (Kontrollkollektiv zu Tab. 36).

Spender	Kontrolle	PHA	Con A	PWM	PPD	HSV	CMV
1	0,3	74	40	116	18	30	1,1
2	0,4	113	104	85	17	20	1
3	0,6	83	54	66	6	8,2	1
4	0,7	62	26	110	54	0,2	0,2
5	0,4	68	109	25	9	8	1,6
6	0,4	53	41	9	0,4	5,9	0,9
7	0,5	118	132	59	41	8	70
8	0,6	39	52	110	6	32	1
9	0,3	73	23	50	6	22	1,5
10	0,5	87	54	110	23	17	5,3
11	0,2	80	130	55	17	1,8	2,6
12	0,5	60	75	63	10	0,4	0,3
13	0,3	140	120	80	3	0,6	50
14	0,4	90	95	70	10	0,5	1
15	0,2	85	100	20	20	18	0,2
16	0,4	120	85	280	110	10	
17	0,3	200	80	55	90	8	3
18	0,5	70	100	60	2	0,2	0,5
19	0,9	158	122	85	14	14	1
20	0,1	94	61	106	15	40	2
21	0,4	70	35	90	12	24	0,8
22	0,9	65	46	63	14	22	0,2
23	0,2	110	76	72	16	5,5	7
24	0,9	80	35	40	0,9	5,1	0,6
25	0,4	44	48	65	7	0,7	0,2
26	0,4	40	21	16	18	1,2	0,6
27	0,1	60	45	34	15	2,5	2,7
28	0,2	37	52	59	22	0,2	0,2
29	0,7	86	81	58	3	20	7,4
30	0,7	40	56	23	64	5,6	13

Tabelle 36. Lymphoproliferation (cpm x 10^3) in Vollblutkulturen von Schizophreniepatienten

Patient	Kontrolle	PHA	Con A	PWM	PPD	HSV	CMV
1	0,8	57	40	100	4,6	13	1,2
2	0,1	10	56	120	23	32	4
3	0,1	59	48	100	0,4	2	1,4
4	0,3	100	47	97	140	15	7
5	0,9	180	135	120	80	1	0,2
6	0,4	110	70	100	15	28	0,5
7	0,6	27	50	80	35	1	0,6
8	0,7	50	60	80	43	12	2
9	0,5	35	50	90	10	28	1,2
10	0,5	44	49	75	34	1	0,3
11	0,1	41	35	29	84	2	0,3
12	0,6	30	49	38	10	0,6	0,2
13	0,1	73	32	33	12	15	12
14	0,4	27	22	35	0,1	0,3	5
15	0,4	72	55	84	23	0,4	0,2
16	0,1	58	36	10	60	1,3	4,8
17	0,3	51	38	72	16	35	0,3
18	0,2	53	27	72	95	22	0,3
19	0,3	20	22	64	2	0,3	0,5
20	0,2	54	40	110	7	17	2,2
21	0,5	65	80	22	10	16	6
22	0,1	48	58	118	125	50	15
23	0,3	68	32	76	9	4,5	0,4
24	0,3	23	18	41	11	5	7,5
25	0,3	100	29	46	6,4	13	6,6
26	0,8	98	66	41	4,5	9	0,9
27	0,2	30	33	30	4,5	0,1	0,3
28	0,1	30	11	11	0,3	3,2	0,3
29	0,1	28	46	21	9,2	0,5	1,0
30	0,1	48	26	27	7	0,1	0,2

30 Schizophreniepatienten wurden mit 30 gesunden Kontrollpersonen (Tab. 35) verglichen. Bezüglich PHA und Con A wurde bei der Patientengruppe bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,01$ signifikant erniedrigte Stimulationswerte gemessen. Bezüglich PWM, PPD, HSV und CMV konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die statistische Analyse wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt.

Tabelle 37. Korrelation der serologischen Daten mit den Ergebnissen der Lymphoproliferation bezüglich HSV (Anzahl der Personen)

			Serologie	
			positiv	negativ
Patienten	Lymphoproliferationstest	positiv	16	0
		negativ	1	13
Kontrollen	Lymphoproliferationstest	positiv	20	0
		negativ	2	8

Tabelle 38. Korrelation der serologischen Daten mit den Ergebnissen der Lymphoproliferation bezüglich CMV (Anzahl der Personen)

			Serologie	
			positiv	negativ
Patienten	Lymphoproliferationstest	positiv	4	5
		negativ	1	20
Kontrollen	Lymphoproliferationstest	positiv	6	1
		negativ	0	23

6.5. Untersuchung der Lymphoproliferation in Vollblutkulturen von Sarkoidose-Patienten

Es sollte untersucht werden, ob sich bei Stimulation mit verschiedenen Mitogenen und Antigenen zwischen Sarkoidosepatienten und gesunden Kontrollpersonen Unterschiede in der Lymphoproliferationsfähigkeit aufzeigen ließen. Die Studie wurde mit 35 Sarkoidosepatienten und 35 gesunden Kontrollpersonen durchgeführt. Die Kontrollpersonen wurden so ausgewählt, daß sie in Alter und Geschlecht mit den Patienten vergleichbar waren. Die Lymphoproliferation wurde in Vollblutkulturen gemessen. Als Stimulantien wurden die unspezifischen Mitogene PHA, Con A und PWM eingesetzt, ferner das Antigen Tuberculin PPD und zwei virale Antigene HSV und CMV. Die Proliferationswerte beider Personengruppen sind in Tab. 39 und Tab. 40 aufgeführt. Die Lymphozyten aller Kontrollpersonen zeigten auf die drei Mitogene eine sehr gute Reaktivität, auch auf PPD, HSV und CMV wurden Ergebnisse erzielt, wie sie in vorhergehenden Untersuchungen beobachtet wurden. Bei den Sarkoidosepatienten wurden hinsichtlich PHA, PPD und CMV mit der Kontrollgruppe vergleichbare Werte erreicht, es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, und auch die Medianwerte differierten nicht wesentlich voneinander. Nach Stimulation mit den Mitogenen Con A und PWM unterschieden sich allerdings Sarkoidosepatienten und Kontrollpatienten signifikant. Es wurden in Vollblutkulturen von Sarkoidosepatienten weit geringere Lymphoproliferationswerte erzielt als von Normalpersonen. Der statistische p-Wert war für beide Mitogene 0,003. Dieser Unterschied war auch bei Betrachtung der Medianwerte erkennbar (Abb. 31), für Con A wurde bei der Kontrollgruppe ein Medianwert von 64300 cpm, bei der Patientengruppe von 36100 cpm errechnet, für PWM lag er bei den Kontrollen bei 65200 cpm und bei den Patienten bei 25500 cpm. Nach Stimulation mit dem viralen Antigen

HSV wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied mit dem Wert p = 0,037 gefunden, auch hier war der Medianwert mit 2600 cpm bei den Patienten im Vergleich zu 11600 cpm bei den Kontrollen deutlich erniedrigt.

Zusätzlich zur Lymphoproliferation wurden mit der ELISA-Technik bei beiden Testgruppen IgG-Antikörper auf HSV und CMV bestimmt. Für beide Antigene zeigte sich in der Kontrollgruppe eine wesentlich bessere Korrelation als in der Patientengruppe. Bezüglich HSV waren 29 Serumproben von Kontrollpersonen mit den Ergebnissen der Proliferation vereinbar, 7 seronegative Individuen zeigten positive zelluläre Reaktion, umgekehrt waren 2 seropositive Kontrollen in der Proliferation negativ. Bei den Sarkoidosepatienten konnte nur bei 18 von 35 Personen eine Korrelation zwischen humoraler und zellulärer Immunität aufgezeigt werden, 17 Personen wiesen Differenzen auf (Tab. 41). Bezüglich CMV war die Sachlage ähnlich, bei den Kontrollen waren 27 Proliferationsergebnisse mit den Serumergebnissen in Einklang zu bringen, 1 negative Kontrollperson war in der Proliferation positiv, 7 in der Proliferation negative Individuen allerdings in der Serologie positiv. Von den Sarkoidosepatienten differierten 12 von 35 Patienten in humoraler und zellulärer Immunität (Tab. 42). Insgesamt ist die Verteilung der positiv bzw. negativ reagierenden Individuen hinsichtlich CMV in der Kontroll- und Patientengruppe gleich, hinsichtlich HSV allerdings ist der Prozentsatz der positiven Patienten in der Proliferation im Vergleich zu den Normalpersonen deutlich erniedrigt, wogegen serologisch 97% der Patienten und 80% der Kontrollen positiv sind.

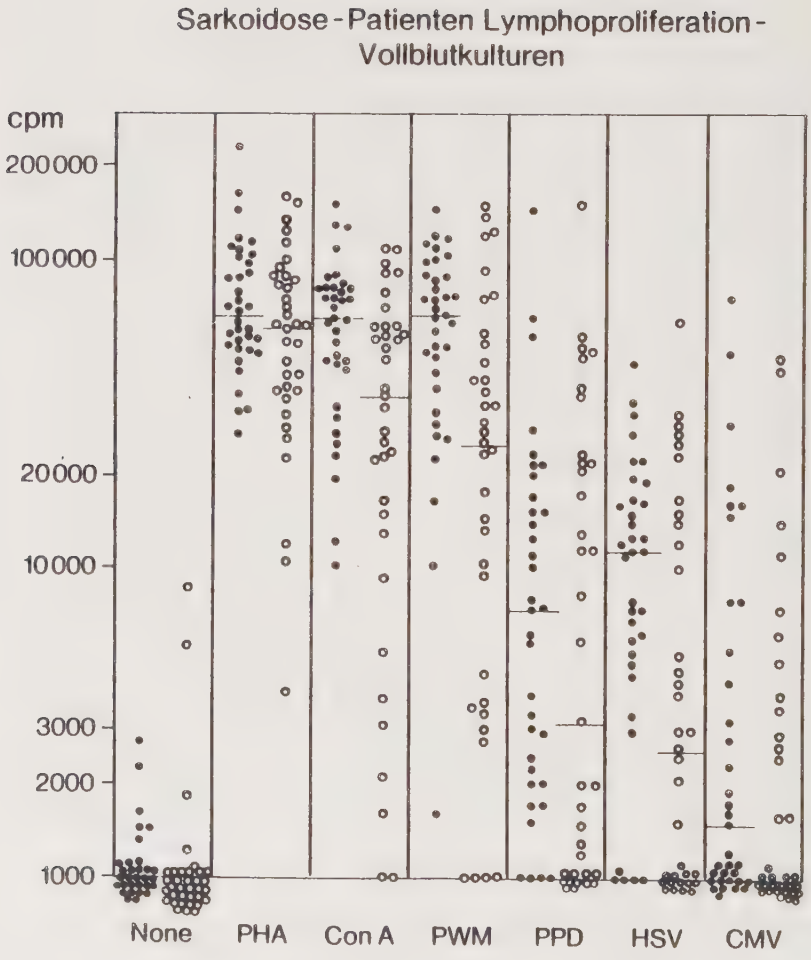


Abb. 31. Lymphoproliferation von Kontrollpersonen und Sarkoidose-Patienten nach Stimulation mit verschiedenen Mitogenen und Antigenen.

● Normalpersonen
O Sarkoidose-Patienten
— Medianwert

Tabelle 39. Lymphoproliferation (cpm x 10^3) in Vollblutkulturen von gesunden Kontrollpersonen (Kontrollkollektiv zu Tab. 40).

Spender	Kontrolle	PHA	Con A	PWM	PPD	HSV	SD*	CMV	SD*
1	2,7	223,4	145,0	104,8	140,3	11,6	+	72,3	+
2	0,6	36,7	71,9	50,6	2,0	5,8	+	1,5	-
3	1,4	107,3	64,3	78,9	3,8	7,6	+	1,9	+
4	0,8	77,4	76,7	98,8	1,5	12,4	-	1,1	+
5	1,4	86,2	78,4	113,4	7,2	19,5	+	3,2	+
6	0,4	49,3	10,3	27,0	5,9	3,0	+	0,7	-
7	1,4	43,6	19,2	62,1	2,0	12,7	+	1,1	+
8	0,5	57,5	42,5	41,8	0,8	18,7	+	0,2	-
9	0,2	113,4	84,9	111,1	23,3	44,4	-	7,8	+
10	0,5	61,6	75,2	74,9	2,2	11,6	-	0,6	+
11	0,2	27,3	24,9	47,4	10,9	11,9	+	16,1	+
12	0,4	101,4	71,2	101,9	15,1	16,3	+	0,4	-
13	0,3	49,7	32,8	51,3	63,4	5,0	+	28,8	+
14	0,4	52,4	47,3	96,1	27,9	7,2	+	0,4	-
15	0,2	47,3	62,5	38,7	12,5	31,4	+	0,3	-
16	0,3	65,8	52,9	50,0	55,1	16,8	+	1,7	-
17	0,7	50,8	67,0	1,6	1,7	0,8	-	1,1	-
18	0,5	101,9	58,7	31,5	7,3	0,5	-	15,9	+
19	0,4	107,9	79,7	85,4	1,7	15,4	+	0,6	+
20	0,3	31,2	11,8	22,1	0,7	7,3	+	0,3	+
21	0,9	52,9	25,7	25,9	20,0	6,8	+	18,0	+
22	0,3	31,9	30,3	28,3	3,0	4,4	+	15,1	+
23	1,6	67,3	44,9	74,0	9,9	3,3	-	0,8	+
24	0,2	56,4	72,9	16,4	0,8	0,6	+	1,2	-
25	0,8	52,9	77,6	72,5	21,6	16,9	+	4,3	+
26	0,4	68,8	77,8	68,5	3,1	5,4	+	5,4	+
27	0,5	47,6	46,1	65,2	7,7	0,7	+	0,2	-
28	0,6	86,8	80,5	58,8	2,4	21,9	+	7,7	+
29	0,3	72,2	23,2	61,9	5,7	21,9	+	2,3	-
30	0,3	141,4	127,1	74,7	2,9	0,4	-	48,9	-
31	0,2	84,2	80,0	142,0	22,1	13,9	+	0,2	-
32	2,2	158,1	122,1	85,6	14,3	10,8	+	1,0	-
33	0,1	95,0	61,0	106,9	15,2	33,8	+	2,8	-
34	0,5	113,3	104,9	85,5	17,1	27,2	+	1,6	-
35	0,4	53,2	41,2	10,0	0,5	6,0	+	0,9	-

*Serologische Daten: IgG

Tabelle 40. Lymphoproliferation (cpm x 10^3) in Vollblutkulturen von Sarkoidose-Patienten

Spender	Kontrolle	PHA	Con A	PWM	PPD	HSV	SD*	CMV	SD*
1	0,3	87,6	0,6	3,4	0,6	17,2	+	10,8	+
2	1,2	46,6	16,3	3,7	19,6	27,0	+	2,7	-
3	0,1	73,5	60,5	32,8	0,2	2,6	+	1,6	-
4	0,1	84,2	58,6	0,4	48,7	4,0	+	3,9	-
5	0,4	60,0	108,4	39,2	21,9	0,6	+	0,4	-
6	0,1	79,5	47,5	44,6	13,3	9,9	+	7,3	+
7	0,1	26,3	1,6	10,1	1,3	0,2	+	0,9	+
8	0,3	27,1	23,8	0,7	0,2	0,3	+	0,9	+
9	0,1	3,9	0,6	2,8	0,1	0,1	+	0,2	+
10	0,2	122,1	49,5	27,9	8,1	4,0	+	0,3	+
11	8,6	112,0	91,1	72,5	21,0	1,5	+	0,9	-
12	0,2	153,8	36,1	25,5	17,5	2,1	+	0,6	-
13	0,6	97,7	22,4	3,0	36,2	23,1	+	0,4	-
14	0,2	69,9	37,6	93,2	22,0	13,6	+	14,1	+
15	0,3	65,7	55,0	134,8	11,4	28,8	+	3,6	+
16	0,8	82,3	90,2	51,6	11,7	24,3	+	2,5	+
17	0,4	22,5	3,8	13,8	0,8	0,7	+	0,3	-
18	0,1	59,5	77,7	113,5	1,7	0,2	-	6,1	+
19	0,3	93,3	53,5	37,5	1,2	0,6	+	20,7	+
20	0,5	130,9	93,9	55,2	23,0	31,3	+	48,2	+
21	1,8	150,7	54,4	117,3	147,2	63,0	+	0,6	-
22	0,4	41,3	59,8	13,0	55,6	4,7	+	0,6	-
23	0,9	41,7	14,6	31,5	52,1	14,6	+	4,9	+
24	0,6	10,4	3,1	0,4	0,6	0,2	+	0,6	+
25	0,5	54,3	32,9	40,4	0,5	12,0	+	0,8	-
26	0,5	38,0	26,3	4,5	3,2	0,7	+	0,4	+
27	5,4	83,9	70,4	142,9	1,5	5,2	+	2,8	-
28	0,4	60,0	9,3	3,5	37,8	2,5	+	1,0	-
29	0,5	36,9	108,1	23,7	0,4	4,2	+	0,6	+
30	0,4	52,3	22,3	17,4	5,9	0,7	+	0,9	-
31	0,3	36,9	12,8	74,4	2,0	1,1	+	0,5	-
32	0,4	12,0	2,1	0,7	0,5	0,3	+	0,3	+
33	0,2	35,7	60,2	26,5	49,0	0,5	+	45,0	+
34	0,4	30,4	5,4	9,5	0,2	0,4	+	0,1	+
35	0,7	58,6	25,1	22,6	0,7	3,0	+	1,6	+

*Serologische Daten: IgG

35 Patienten mit Sarkoidose wurden mit 35 gesunden Kontrollpersonen verglichen. Nach Stimulation mit PHA, PPD und CMV konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bezüglich Con A, PWM und HSV war allerdings die Stimulationsfähigkeit der Lymphozyten von Sarkoidosepatienten deutlich erniedrigt; das Signifikanzniveau war für Con A und PWM auf $p = 0{,}003$, für HSV auf $p = 0{,}037$ festgelegt worden. Die statistische Analyse wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt.

Tabelle 41. Korrelation der serologischen Daten mit den Ergebnissen der Lymphoproliferation bezüglich HSV (Anzahl der Personen)

			Serologie	
			positiv	negativ
Patienten	Lymphoproliferationstest	positiv	17	0
		negativ	17	1
Kontrollen	Lymphoproliferationstest	positiv	26	4
		negativ	2	3

Tabelle 42. Korrelation der serologischen Daten mit den Ergebnissen der Lymphoproliferation bezüglich CMV (Anzahl der Personen)

			Serologie	
			positiv	negativ
Patienten	Lymphoproliferationstest	positiv	9	1
		negativ	11	14
Kontrollen	Lymphoproliferationstest	positiv	11	1
		negativ	7	16

VI. DISKUSSION

Die zelluläre Grundlage der antigenspezifischen Immunität bilden immunkompetente Lymphozyten. Sie entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen zu den für die Antikörperbildung verantwortlichen B-Lymphozyten und den für zelluläre Immunreaktionen verantwortlichen T-Lymphozyten. Die funktionelle Diversität der beiden morphologisch nicht unterscheidbaren Lymphozytenpopulationen wurde bereits 1962 eindeutig nachgewiesen (Warner et al., 1962; Alexander et al., 1976).

Die spezifische, humorale Immunabwehr wird durch Antigene induziert und mit der Produktion von antigenspezifischen Antikörpern, den Immunglobulinen, beantwortet. Durch T-Lymphozyten induziert und reguliert werden in B-Lymphozyten Antikörper mit antigenspezifischen Bindungsstellen gebildet, die gegen viele verschiedene spezifische antigenen Determinante gerichtet sind. Die Produktion von Antikörpern übernehmen die Plasmazellen. Die Immunglobuline bewirken durch ihre antigenspezifische Bindung Neutralisation, Opsonisation, Präzipitation, Agglutination, Komplementaktivierung und Phagozytose-Intensivierung sowie eine Inaktivierung und Elimination von Antigenen aus dem Organismus.

Nach einer Antigenstimulation sind für die spezifische, zelluläre Immunabwehr die T-Lymphozyten verantwortlich. Die T-Lymphozyten differenzieren im Thymus. Die determinierten Lymphozyten verlassen den Thymus und siedeln sich, wie die B-Zellen, in Lymphknoten und Milz an. Die Mehrzahl der zirkulierenden Lymphozyten sind T-Zellen. Die Rezeptoren an der Zelloberfläche der T-Lymphozyten sind nicht wie bei den B-Lymphozyten Immunglobuline, ihre genaue Struktur ist noch unbekannt. Werden T-Zellen durch eine Interaktion ihres Rezeptors mit einem Antigen stimuliert, reagieren sie in verschiedener

Weise. Sie üben Helferfunktionen aus, indem sie durch Sekretion von bestimmten Faktoren auf B-Zellen wirken und damit diese bei der Antikörperproduktion unterstützen. Die Stimulation von T-Zellen führt weiterhin zu einer Entwicklung von zytotoxischen Zellen. T-Zellen entwickeln auch, als Gegenstück der Helfer-Funktion, eine Suppressor-Funktion, welche in erster Linie auf die Antigenstimulation einwirkt. Diese beeinflußt sowohl die B-Zellaktivität als auch einige Funktionen der zellulären Immunität. Beide Funktionen spielen die Hauptrolle in der Regulation der Immunantwort. Die regulatorischen T-Zellaktivitäten werden durch lösliche Faktoren vermittelt, die als Lymphokine bezeichnet werden.

Bestimmte Interferonsubtypen gehören zur Gruppe der Lymphokine. Sie werden von weißen Blutzellen gebildet und wirken immunregulatorisch. Neben der antiviralen Wirkung haben alle Interferone in vitro eine Vielzahl von Wirkungen auf die zellulären Komponenten des Immunsystems. NK-Zellen und Makrophagen werden aktiviert. Die Produktion von IFN-γ ist nicht beschränkt auf die Antigen- oder Alloantigen-Erkennung. In Bakterien oder Mykoplasmen kommen ebenfalls Induzenten von IFN vor, und nicht sensibilisierte T-Lymphozyten bilden IFN nach einem Kontakt mit diesen Induzenten. Die Produktion von IFN dient auch als Verstärkermolekül in der Primärabwehr von Mikroorganismen. Interferone sind daher ein wichtiger Bestandteil der körpereigenen Abwehr.

Das Herpes Simplex Virus (HSV) und das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehören zur Gruppe der Herpesviren, die eine Vielzahl verschiedener Viren der meisten Tierspezies und des Menschen umfaßt. Infektionen beim Menschen mit HSV und HCMV sind häufig und verlaufen in den meisten Fällen asymptomatisch oder sehr leicht. Dennoch kann es in bestimmten Fällen zu schwerwiegenden Infektionen kommen. Generalisierte Infektionen kommen in Neugeborenen mit noch unausgereiftem Immunsystem vor und in Patienten, deren Abwehrsystem in seiner Funktion beeinträchtigt ist. Dies ist der Fall, wenn das natürliche An-

passungsgleichgewicht zwischen dem Abwehrsystem des Wirts und dem Virus gestört wird, z.B. bei Immunsuppression durch Transplantationen, Bluttransfusionen, bei malignen Tumoren und Immundefekten oder iatrogen durch medikamentöse Immunsuppression (Schooley et al., 1983). Darüberhinaus ist bekannt, daß HCMV selbst eine immunsupprimierende Wirkung besitzt (Rinaldo et al., 1977). Diese Wirkung wird vor allem gefährlich bei Empfängern von Organtransplantaten wie Knochenmark und Niere oder von massiven Bluttransfusionen. Das Virus wird bei Transplantationen hauptsächlich durch das Organtransplantat übertragen (Ho et al., 1975; Betts et al., 1975); bei Bluttransfusionen sind Leukozyten die Virusüberträger (Lang et al., 1972). Tolkoff-Rubin et al. (1978) konnte zeigen, daß Leukozyten-depletierte Transfusionen das Risiko der Erkrankung minimieren. Aus der Tatsache, daß das HCMV zwar aus den Leukozyten Erkrankter, aber nur sporadisch aus Leukozyten Gesunder isoliert worden ist (Diosi et al., 1969; Macher et al., 1983), haben Lang (1972) und später Kirchner (1983) und Hirsch (1984) geschlossen, daß HCMV in Leukozyten in latenter Form vorliegt, aus der das Virus durch den Kontakt mit Fremdantigen, d.h. Leukozyten des Blutempfängers, zur produktiven Infektion reaktiviert wird. Der umgekehrte Weg, Reaktivierung aus den Leukozyten des Konservenempfängers, erscheint weniger wahrscheinlich, weil es sich bei dem Krankheitsbild meist um eine primäre Infektion handelt (Lang und Hanshaw, 1969).

Da bei der Abwehr von Infektionen durch HSV und CMV die zelluläre Immunität eine wichtige Rolle spielt und bisherige Methoden zur Erfassung der spezifischen zellulären Immunreaktion gegenüber viralen Antigenen zum Einsatz in der Routinediagnostik nicht geeignet sind, wurde ein Testsystem entwickelt - die Vollbluttechnik -, welche vergleichsweise einfach durchzuführen ist und gut standardisiert werden kann. Mit dieser Vollbluttechnik sollte ermöglicht werden, in Patienten sowohl die allgemeine Immunkompetenz als auch die anti-

virale zelluläre Immunität z.B. gegen HSV und CMV messen zu können. Weiterhin sollte mit einer einzigen Blutprobe Lymphozytenproliferation und parallel dazu die Interferonproduktion ausgetestet werden. Bei den bisherigen Testsystemen wurden mononukleäre Zellen verwendet, die mit Hilfe eines Dichtegradienten aufgetrennt wurden. Jene Techniken haben eine Reihe von Nachteilen. Man benötigt eine relativ große Blutmenge, und der Leukozytensuspension muß Fremdserum zugesetzt werden. Darüberhinaus führt eine Auftrennung der Zellen zu einer Veränderung der relativen Blutzusammensetzung, die In-vivo-Verhältnisse der zellulären Bestandteile des Bluts werden verändert. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt, der gegen den Einsatz solcher Testsysteme in der Routinediagnostik spricht, ist der hohe Material- und Zeitaufwand.

Um diese Nachteile zu vermeiden, wurde heparinisiertes Vollblut mit allen physiologischen Zell- und Serumbestandteilen verwendet. Bei der Untersuchung des Mischungsverhältnisses Vollblut zu Medium konnten mit den T-Zell Mitogenen PHA und Con A und dem viralen Antigen HSV-1 bei einem Verhältnis von 1:15 optimale Proliferationsraten und Interferontiter gemessen werden. Dieses Mischungsverhältnis entspricht bei gesunden Erwachsenen einer Leukozytenzahl von 10^6/ml. Dies bedeutet, daß man nur eine sehr geringe Blutmenge benötigt, um Lymphoproliferation und Interferonproduktion auszutesten.

Um die Vollblutkulturen mit viralen Antigenen stimulieren zu können, mußte gewährleistet werden, daß die Virussuspension rein, d.h. frei von Mykoplasmen war. Bei einer Untersuchung stellte sich heraus, daß dies der Fall für HSV-1 war, daß aber HCMV mit Mykoplasmen kontaminiert war. Die negativen Auswirkungen einer solchen Kontamination sind eingehend diskutiert worden (MacPerson, 1966; Manischewitz et al., 1975; Biberfeld und Gronowicz, 1976). Als häufigste Mykoplasmenarten in Zellkulturen wurden M. orale (29%), M. arginini (26%), M. hyorhinis (21%) und M. laidlawii (9%) isoliert (Barile, 1981). Die häufig-

sten Kontaminationsquellen sind kommerzielle Rinderseren und unsachgemäßes Pipettieren. Mykoplasmen verändern im Gegensatz zu Hefen und Pilzen Zellkulturen, ohne daß dies sichtbar wird. Oft werden weder funktionelle noch morphologische Veränderungen hervorgerufen, aber insbesondere bei Untersuchungen immunologischer Phänomene besteht die Gefahr von Artefakten durch kontaminierte Zellinien (MacPerson, 1966). Mykoplasmen können zum einen in Lymphozytenkulturen Interferon induzieren und dadurch auch die Virusreplikation verhindern; zum anderen können sie u.a. die Mitose von Zellen inhibieren, Chromosomenbrüche hervorrufen und das Medium an Nährstoffen depletieren. Desweiteren kann je nach Mykoplasmenspezies eine Hemmung der Proliferation auf PHA in Lymphozytenkulturen (Copperman und Morton, 1966) oder eine Hemmung der ^{3}H-Thymidinaufnahme mitogenstimulierter Lymphozyten erfolgen. Diese Hemmung wird durch Depletion von Arginin im Medium durch Arginin-hydrolysierende Mykoplasmen, z.B. M. arginini, hervorgerufen (Cole et al., 1977). Schließlich gibt es auch Mykoplasmen, die sich als potente B-Zell-Mitogene erwiesen haben (Übersichten bei Cole et al., 1976; Biberfeld und Gronowicz, 1976; Kirchner et al., 1977; Beck et al., 1982). Somit war es von äußerster Wichtigkeit, die verwendeten Virusstämme durch Transfektion von Mykoplasmen zu reinigen, um die Gefahr auszuschalten, daß Mykoplasmen-kontaminiertes Virus die Versuchsergebnisse negativ beeinflußte. Die transfizierten Virusstämme wurden verschiedenen Mykoplasmentests unterworfen und erwiesen sich als mykoplasmenfrei.

Zellen benötigen neben essentiellen Nährmischungen aus Salzen, Zuckern, Aminosäuren und Vitaminen für ihre Aktivierung und Proliferation einen Zusatz von biologischen Stoffen oder Extrakten. Am häufigsten wird Serum als Zusatz verwendet. Dieser Zusatz ist weniger charakterisiert und seine aktiven Faktoren beeinflussen die Funktion der Zellkulturen. Durch verschiedene Untersuchungen wurde festgestellt, daß zusätzliches Serum im Vollbluttest keine Vorteile bringt.

Sowohl bei der Proliferation als auch bei der Induktion von IFN konnte im Vergleich zu Vollblutkulturen, die autologes Serum enthielten, kein steigernder Effekt festgestellt werden. So erscheint es günstig, daß für die Vollblutkulturen das Eigenserum ausreichend ist und so durch Fremdserum kein zusätzlicher unbekannter Faktor in das Testsystem eingebracht wird.

Die Austestung der Standardmedien RPMI 1640 und M199 ergab, daß mit Medium M199 weit geringere Proliferationsdaten erzielt wurden als mit Medium RPMI 1640. Somit wurde in allen Tests das Vollblut mit RPMI 1640 verdünnt. Eine Lagerung der Blut/Medium Mischung vor der Austestung auf Proliferation und Interferonproduktion über 24 Std. hatte sowohl bei 37°C wie auch bei 4°C keinen Einfluß auf die Höhe des Versuchsergebnisses. Somit ist es möglich, Blutproben einen Tag nach der Entnahme im Labor auszutesten.

Für die Mitogene konnte bei Lymphoproliferationsversuchen eine optimale Inkubationszeit von 3 bis 4 Tagen festgestellt werden, für das bakterielle Antigen PPD und die zwei viralen Antigene HSV und CMV zeigte sich allerdings erst nach 7 Tagen ein Inkubationsoptimum. Zur Austestung der Interferonproduktion im Vollblut konnten nach Stimulation mit den Mitogenen nach 72 Std. die höchsten Interferontiter gemessen werden, für das virale Antigen HSV-1 genügten 24-48 Std. Es wurde weiterhin festgestellt, daß Tuberculin PPD und das virale Antigen CMV schlechte Interferoninduzenten sind.

In der Literatur wurden schon mehrfach Vollbluttests beschrieben, mit denen die HSV-induzierte Proliferation gemessen worden war (Junge et al., 1970; Pauly et al., 1973; Russel, 1974; Liu et al., 1975; El Araby et al., 1978). Es gelang aber in keinem Fall, nach diesen Beschreibungen mit einem viralen Antigen positive Ergebnisse zu erzielen. Es stellte sich heraus, daß die richtige Wahl der 96-Loch-Mikrotiterplatten von entscheidender Bedeutung ist. Routinemäßig werden für Proliferations- und Interferonversuche Flachbodenplatten verwendet.

Für die Interferoninduktion in Vollblut konnten schon früher positive Ergebnisse in Flachbodenplatten gefunden werden (Kirchner et al., 1982). Für Lymphoproliferationsversuche in Vollblutkulturen wurden nach Stimulation mit unspezifischen Mitogenen in Flachbodenplatten ebenfalls gute Werte erzielt. Nach Stimulation mit bakteriellen und viralen Antigenen dagegen konnten keine Proliferationswerte gemessen werden. Dies führte zu dem Schluß, 96-Loch-Rundbodenplatten für den Test einzusetzen. Die Ergebnisse zeigten, daß für die bakteriell und viral induzierte Proliferation Rundbodenplatten zwingend notwendig waren. Es wurden auf Antigenstimulation in Rundbodenplatten optimale Werte erzielt, wogegen in Flachbodenplatten keine Stimulationsantwort beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu konnten auf Mitogenstimulation in beiden Plattenarten positive Ergebnisse erzielt werden.

Üblicherweise wurde das Vollblut mit dem Antikoagulans Heparin-Natrium versetzt. Trotzdem stellte sich die Frage, ob andere Antikoagulantien genauso gut oder eventuell noch besser geeignet sind. Es stellte sich heraus, daß Vollblut mit Zusatz von Na-Citrat bei Lymphoproliferationsversuchen geringere Werte aufzeigte, bei Interferonversuchen lagen die IFN-Titer allerdings im gleichen Bereich wie mit Heparin-Na. Der Zusatz von K-EDTA erwies sich dagegen bei beiden Versuchsarten als nicht geeignet. Desweiteren wurde festgestellt, daß die Inkubationsbedingungen für stimulierte Vollblutkulturen nicht unbeachtet werden dürfen. Optimale Ergebnisse sowohl für die Lymphoproliferation als auch für die Interferoninduktion lagen bei einem CO_2-Gehalt von 5%.

Bei der Austestung der Kulturüberstände von Vollblutkulturen auf Interferon wurde im Gegensatz zu Interferontitrationen aus Kulturen mit isolierten Lymphozyten festgestellt, daß im Kontrollwert scheinbare Interferontiter gemessen wurden. Um zu untersuchen, ob es sich hier um ein Artefakt oder um tatsächliches Interferon handelte, wurde versucht, die Kulturüberstände mit verschiedenen

Anti-Interferonen zu neutralisieren. Da sich diese Titer nicht reduzieren ließen, wurde der Schluß gezogen, daß es sich hier nicht um IFN handeln konnte. Weitere Versuche, die eine Verdünnung der Proben mit Medium beinhalteten, zeigten, daß je höher die Verdünnungsstufe war, desto niedriger wurde der gefundene Titer. Somit wurden die inkubierten Testüberstände vor der Infektion mit VSV zweimal mit Medium gewaschen. Die Ergebnisse zeigten, daß durch diesen Schritt die Kontrollen keine Titer mehr aufwiesen. Es wird vermutet, daß es sich hier um eine Kreuzreaktion zwischen VSV und Antikörper in den Vollblutkulturen, die ja Eigenserum enthielten, handelte. Durch den zweimaligen Waschvorgang vor der Infektion konnten diese somit entfernt werden.

Von der Vollbluttechnik wird erwartet, daß man sie in der Routinediagnostik einsetzen kann, um bei Patientengruppen sowohl die allgemeine Immunkapazität als auch die spezifische Immunkapazität gegenüber viralen und bakteriellen Antigenen zu erfassen. Diese Forderung sollte zunächst mit Hilfe eines Normalkollektivs, d.h. einer gesunden Blutspendergruppe, untersucht werden (Leroux et al., 1985). Das Normalkollektiv bestand aus 104 Personen, deren Blutproben mit unspezifischen Mitogenen, mit einem bakteriellen Antigen Tuberculin PPD und zwei viralen Antigenen HSV-1 und CMV stimuliert wurden. Wie die Ergebnisse aufzeigen, hat die Vollbluttechnik gegenüber den herkömmlichen Methoden mit isolierten Lymphozyten entscheidende Vorteile. Die Blutmenge kann erheblich reduziert werden, was für Untersuchungen in der Pädiatrie von Bedeutung ist, der Material- und Zeitaufwand ist gering zu halten, sodaß eine größere Anzahl von Patienten ausgetestet werden kann. Auch Unsicherheitsfaktoren, die durch Zusatz von Fremdserum auftreten könnten, können außer Betracht gelassen werden. Weiterhin können mit einem Testansatz die spezifische zelluläre Immunität gegen Viren und die allgemeine Immunkapazität sowohl durch Lymphoproliferation als auch durch Interferoninduktion bestimmt werden.

Eine mögliche Unzulänglichkeit des Vollbluttests könnte sein, daß mit Blut von leukopenischen Patienten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, daß Schwankungen in der Leukozytenzahl, wie sie bei gesunden Erwachsenen vorkommen, die Lymphoproliferations- und Interferonwerte nicht beeinflussen, sodaß es nicht notwendig ist, in den einzelnen Versuchen die Leukozyten durch Verdünnung auf eine bestimmte Zellzahl einzustellen.

Die zelluläre antivirale Immunkapazität wurde gegen CMV und HSV bestimmt. HSV betreffend wurde eine weitgehende Korrelation zwischen humoraler Immunität und Lymphoproliferationswerten erzielt; die Mehrzahl der im ELISA-Test gefundenen HSV-positiven Individuen reagierten auch im Vollbluttest positiv. CMV betreffend wurde keine klare Korrelation zwischen humoraler und zellulärer Immunität gefunden, eine größere Anzahl seropositiver Individuen zeigte keine Reaktion in der Proliferation. Eine Erklärung für diese Ergebnisse konnte zunächst nicht gefunden werden, da viele Individuen, die auf CMV nicht reagierten, sehr gute Proliferationsdaten auf PPD oder HSV lieferten. Dies war ein Hinweis, daß grundsätzlich die Fähigkeit der Lymphozyten vorhanden war, auf monoklonale Stimulation durch Antigene zu antworten. Andere Individuen dagegen zeigten sehr gute Werte auf CMV, dies wurde auch bei mehrmaliger Austestung dieser Individuen festgestellt.

Es wurden einige Möglichkeiten in Betracht gezogen, warum die Zahl der im Antikörper-Test Positiven um soviel höher war als die Zahl der zellulär Positiven. Vergleichende Versuche zwischen der Vollbluttechnik und über Ficoll-Isopaque Gradienten isolierten Lymphozyten zeigten, daß alle Spender, die im Vollbluttest auf CMV negativ reagierten, auch in der herkömmlichen Methode negativ waren. Der Verdacht, daß die CMV-Präparation nicht genügend aufgereinigt war und eventuell einen Hemmfaktor für die Lymphozytenproliferation

enthielt, wurde durch Versuche mit einem über Succrosegradienten aufgereinigten CMV-Antigen beseitigt; mit dieser neuen Viruspräparation konnten keine zusätzlichen positiven Individuen entdeckt werden.

Es wurde weiterhin überlegt, ob die Ursache in der Heterogenität der CMV-Stämme liegen könnte. Beutner et al. beschrieben 1978, daß diese Heterogenität die Ergebnisse des Proliferationstests beeinflussen kann, diese Möglichkeit wurde aber durch die Untersuchungen von Gärtner et al. (1982) ausgeschlossen. Auch in dieser jetzigen Studie wurden durch einen weiteren CMV-Stamm, CMV-Davis, keine zusätzlichen Reaktanten gefunden.

Von 40 seropositiven Spendern zeigten 19 Personen in der zellulären Immunität gegenüber CMV keine Reaktion. Obwohl die ELISA-Technik zur Feststellung von Serumantikörpern sensibler ist als die Tests der Komplement-Bindungs-Reaktion oder der passiven Hämagglutination, kann die Möglichkeit von falsch positiven Antikörpertitern nicht völlig ausgeschlossen werden. Solche falsch positiven Ergebnisse wurden in der Literatur schon mehrmals beschrieben und diskutiert, daß es sich um eine Kreuzreaktivität von antinukleären Antikörpern mit einer Reihe von Antigenen handelt. Dieses Phänomen wurde gelegentlich in mit EBV infizierten Patienten gefunden (Hanshaw et al., 1972; Schmitz et al., 1977a,b; Hekker et al., 1979; Krishna et al., 1980).

Die in der Literatur beschriebenen Lymphoproliferationsversuche nach Stimulation mit CMV (Møller-Larsen et al., 1975/76; Ten Napel et al., 1977; Beutner et al., 1978; Pollard et al., 1978; Rytel et al., 1978; Starr et al., 1979; Schirm et al., 1980; Wahren et al., 1981; Gärtner et al., 1982; Faix et al., 1983) wurden bei gesunden Personen und bei Patienten mit CMV-assoziierten Krankheiten durchgeführt. In einigen dieser Studien wurden annehmbare Korrelationen zwischen positiven Antikörpertitern und den Ergebnissen im Proliferationstest gefunden, in anderen wiederum wurde eine Anzahl seropositiver Probanden gefunden, die

in der Proliferation negativ waren (Krishna et al., 1980; Schirm et al., 1980). Man kann allerdings die Signifikanz etlicher in der Literatur angegebenen positiven Proliferationsraten anzweifeln, da häufig ein Proliferationswert, der das 2,5-3,5 fache des Kontrollwerts aufzeigt, schon als positiv gewertet wurde.

Pollard et al. (1978) berichteten, daß ungefähr die Hälfte von 20 seropositiven Spendern eine Proliferationsrate gegenüber CMV zwischen dem 2,5- und 5-fachen Wert des Kontrollwerts aufwiesen. In dieser Studie wurde der Nachweis der Serumantikörper mit dem wenig sensitiven Komplementbindungs-Test durchgeführt. In dieser vorliegenden Studie an 104 Normalpersonen waren im ELISA-Test ungefähr 40% der Individuen CMV-seropositiv. Dies scheint ein angemessener Prozentsatz für eine überwiegend jüngere und gesunde Bevölkerung eines mitteleuropäischen Landes zu sein. In einer Studie in Dänemark (Melbye et al., 1983) wurden mit der Komplementbindungs-Reaktion in einer gesunden Bevölkerung 30% seropositive Individuen gefunden. Zweifellos ist der Komplementbindungs-Test weniger sensitiv als der ELISA-Test, aber es ist bis jetzt unklar, warum der ELISA falsch positive Ergebnisse liefert. Auch in einer weiteren Studie einer gesunden Bevölkerungsgruppe wurde mit demselben CMV-Antigen, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ein ähnlicher Prozentsatz positiver Individuen im Proliferationstest gefunden (Doldi et al., 1985).

Rosenberg et al. (1974) und Kirchner et al. (1978) fanden bei Untersuchungen von Patienten mit häufig rezidivierenden HSV-Infektionen eine gute Korrelation zwischen Antikörpertests und den Ergebnissen der zellulären Immunität, wie es auch in dieser Arbeit für HSV der Fall ist. In den Veröffentlichungen von 1974 und 1978 wurde weiterhin beobachtet, daß nach einer Rekurrenz einer HSV-Infektion die Proliferationsrate auf HSV anstieg, wogegen im krankheitsfreien Stadium die Stimulationsantwort auf HSV signifikant erniedrigt war. HSV-Antikörpertiter wurden weiterhin festgestellt. Es wird vermutet, und dies mag auch

für CMV der Fall sein, daß die Diskrepanz zwischen humoraler und zellulärer Immunität darauf beruht, daß die zelluläre Immunität nur für eine bestimmte Zeit nach einer Infektion gemessen werden kann, während die humorale Immunität wesentlich längere Zeit bestehen bleibt.

Nissen et al. (1981) zeigten, daß bezüglich der Mitogenstimulation die Ergebnisse, die mit der Vollbluttechnik erzielt wurden, nicht mit denen aus der Ficoll-Isopaque-Gradienten-Isolation übereinstimmten. Dennoch wurden von dieser Arbeitsgruppe wie auch in dieser Dissertation mit der Vollbluttechnik sehr gute Ergebnisse erzielt, und es stellt sich die Frage, ob ein Vergleich dieser Methode mit Methoden, die mit isolierten Zellen durchgeführt werden, vonnöten ist. In dieser Arbeit wird aufgezeigt, daß bezüglich der Mitogene und der beiden Antigene HSV und PPD zufriedenstellende Ergebnisse erzielt wurden. Die Ergebnisse mit CMV waren weniger befriedigend, und die Ursache dafür könnte sein, daß die Zahl der auf CMV reagierenden Lymphozyten sehr gering ist und vor der Stimulation durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation erhöht werden muß.

Weitere Kontrollkollektive für den Vollbluttest stellten Studien dar, die aus 16 Nabelschnurblutproben und 7 Säuglingen bestanden. Wie erwartet wurde in keiner der beiden Studien eine spezifische Lymphozytenreaktion gegenüber viralen Antigenen beobachtet. Gegenüber den Mitogenen war die Proliferationsrate im Nabelschnurblutkollektiv wesentlich geringer als bei den Säuglingen. Diese Befunde zeigen, daß weder das spezifische noch das unspezifische zelluläre Abwehrsystem bei Neugeborenen voll ausgereift ist. Es ist anzunehmen, daß darin die Ursache für die erhöhte Infektanfälligkeit bei Neugeborenen zu sehen ist. So können vor allem HSV-Infektionen eine akute Lebensgefährdung darstellen, da die Infektionen aufgrund der zellulären Abwehrschwäche oft generalisiert verlaufen.

Nachdem die Vollbluttechnik mit Hilfe des Normalkollektives etabliert worden war, wurden verschiedene Patientenkollektive hinsichtlich ihrer Kapazität

des zellulären Immunsystems untersucht. Die erste Gruppe bestand aus Patienten, die sich einer Operation am offenen Herzen unterzogen hatten (Leroux et al., 1986). Bei 45 Patienten und 45 Kontrollpersonen wurde die zelluläre Immunantwort auf die Mitogene PHA, Con A, PWM, das bakterielle Antigen Tuberculin PPD und das virale Antigen HSV untersucht. Die Patienten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten ausgetestet, vor der Operation, eine Woche nach und zwei Wochen nach der Operation.

Operationen, insbesondere Herzoperationen, haben einen nachteiligen Effekt auf das zelluläre Immunsystem, die lymphozytäre Antwort auf unspezifische Mitogene wie Phytohemagglutinin und Concanavalin A wird vermindert (Berenbaum et al., 1973). Während die bisherigen Studien an diesen Patienten mit dem herkömmlichen Lymphozytentransformationstest anhand der Ficoll-Isopaque-Gradientenzentrifugation durchgeführt wurden, wurde in dieser Arbeit die Vollbluttechnik angewendet. Es konnte gezeigt werden, daß mit dieser Technik zu den bisherigen Methoden vergleichbare Ergebnisse gefunden wurden, so daß die Vollblutmethode geeignet ist, eine Verminderung der Immunkapazität der peripheren Blutlymphozyten sowohl gegenüber unspezifischen Mitogenen als auch gegenüber einem bakteriellen und einem viralen Antigen aufzuzeigen. In dieser vorliegenden Studie wurde eine Woche nach der Operation eine deutliche Abnahme der Lymphozytenreaktivität vermerkt. Bei Untersuchungen der Patienten zwei Wochen nach der Operation wurde ein Anstieg der Proliferationsraten erwartet, aber es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Proliferationswerte zwischen den Ergebnissen einer Woche nach und zwei Wochen nach Operation gefunden werden. Bei Betrachtung der Medianwerte allerdings zeigte sich außer für Con A ein leichter Anstieg der Lymphoproliferation. Beim Vergleich der Werte vor der Operation und zwei Wochen nach der Operation konnte für die Antigene PPD und HSV bei einem Signifikanzniveau von $p < 0{,}001$ kein signifikanter Unter-

schied festgestellt werden; bezüglich der Mitogene PHA und PWM allerdings betrugen die Signifikanzwerte p = 0,009 bzw. 0,01. Dies war ebenfalls beim Vergleich der Medianwerte erkennbar, so daß zwei Wochen nach der Operation von einer Tendenz zur Normalisierung des Immunstatus der Patienten gesprochen werden kann. In der Literatur wurde verschiedentlich berichtet, daß zur Normalisierung der Lymphozytenfunktion ein längerer Zeitraum benötigt wird, teilweise hielt die postoperative Suppression der zellulären Immunität tagelang bis wochenlang an (Bröcker und Macher, 1981; Salo et al., 1981). Es wird vermutet, daß wenn es in dieser Studie möglich gewesen wäre, die Immunitätslage der Patienten zu einem späteren Zeitpunkt nochmals auszutesten, ebenfalls eine Normalisierung der zellulären Immunität hätte gefunden werden können.

Die Ursachen für die Unterdrückung des zellulären Immunsystems nach Operationen sind unklar. Sie wurden in der Literatur schon mehrfach diskutiert, wobei aber die Meinungen der einzelnen Autoren auseinandergehen. Zum einen wird für den immunsuppressiven Effekt das operative Trauma und der operative Streß verantwortlich gemacht (Riddle und Berenbaum, 1967; Berenbaum et al., 1974; Cullen und Van Belle, 1975; Bröcker und Macher, 1981). Zum anderen gibt es Hinweise, daß dieser Effekt auf das Zusammentreffen verschiedener Faktoren wie Trauma, Streß, Anästhesie, Menge des Blutverlusts und Dauer der Operation zurückzuführen ist (Lee, 19771 Koenig et al., 1978; Salo, 1978; Petri et al., 1981). Bröcker und Macher (1981) vermuten, daß der Zeitraum von mehreren Wochen bis zur Normalisierung der zellulären Immunität allein durch das operative Trauma bedingt ist.

Einige Autoren beschäftigten sich mit der Frage, in wieweit Bluttransfusionen das zelluläre Immunsystem beeinflussen können. In Veröffentlichungen über Nierentransplantationen (Fischer et al., 1980) und Dialysepatienten (Roy et al., 1984) wurde auf Stimulation mit Mitogenen und Antigenen eine deutliche

Suppression der zellulären Immunität nach Bluttransfusionen gefunden. In manchen Fällen hing dieser immunsuppressive Effekt von der Menge der Bluttransfusionen ab; bei Nierentransplantationen ist dies ein günstiger Effekt für die Erfolgsquote solcher Operationen. Riddle und Berenbaum (1967) dagegen fanden keinen Zusammenhang zwischen zellulärer Immunsuppression und Bluttransfusionen. Sie beobachteten bei allen Patienten, die sich einer Operation unterzogen, unabhängig von Bluttransfusionen eine Reduktion der Lymphoproliferation.

Ein weiterer Aspekt der Depression der zellulären Immunität bei Herzoperationen wurde von Mavligit et al. (1985) beschrieben. Danach sind viele Patienten, die durch Bluttransfusionen an AIDS erkrankten, Patienten, die sich einer Operation am offenen Herzen unterzogen hatten. Die Autoren nehmen an, daß die Immundysregulation, die durch einen kardiopulmonalen Bypass hervorgerufen wird, ein prädisponierender Faktor für durch Bluttransfusionen hervorgerufenes AIDS sein könnte.

Eine weitere Patientengruppe, die hier untersucht wurde, stellten männliche Homosexuelle dar, bei denen ein Lymphadenopathie-Syndrom festgestellt worden war. Auch bei ihnen wurde mit der Vollbluttechnik die zelluläre Immunkapazität auf zwei Mitogene PHA und PWM und auf ein virales Antigen, CMV, untersucht und die Ergebnisse mit denen einer Kontrollgruppe verglichen. Zusätzlich wurden Serum-Antikörper gegen CMV bestimmt und überprüft, in wieweit die Korrelation zwischen Antikörpertiter und Lymphoproliferationsfähigkeit vorlag (Doldi et al., 1985). Der Verdacht, daß zwischen AIDS bzw. dem Kaposi Sarkom und HCMV-Infektionen ein kausaler Zusammenhang bestehen könnte, beruhte auf der Feststellung von viralen Nukleinsäuren in einigen Tumorbiopsien (Giraldo et al., 1980) und wurde durch seroepidemiologische Daten aus Europa und Amerika bestärkt (Giraldo et al., 1975; Giraldo et al., 1978). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß 100% der Patienten, aber nur 30% der Kontrollpersonen Serum-

Antikörper gegen CMV aufwiesen. Auch in anderen Studien wird beschrieben, daß bei Homosexuellen mit einem Lymphadenopathie-Syndrom der Durchseuchungsgrad mit CMV höher lag als bei männlichen Heterosexuellen und daß CMV-Infektionen bei Homosexuellen häufig vorkommen (Gottlieb et al., 1981; Detels ét al., 1984; Mindel und Sutherland, 1984).

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, daß die Anzahl der Positiven in der zellulären Immunreaktion nach Stimulation mit CMV bei der Patientengruppe mit 84% höher lag als bei der Kontrollgruppe mit 66%. Desweiteren waren die Medianwerte der durch CMV induzierten Proliferation in der Patientengruppe signifikant höher als bei den gesunden Personen. Für die PHA- und PWM-induzierte Proliferation konnten ähnliche Ergebnisse gefunden werden. Diese Erkenntnisse sind bereits für PWM bei männlichen Homosexuellen mit und ohne Lymphadenopathie-Syndrom in der Literatur beschrieben worden (Kalden et al., 1983; Manger et al., 1984).

Der Vergleich zwischen der zellulären Antwort auf CMV und dem humoralen Status zeigte für die Patienten eine gute Korrelation auf. Alle Homosexuellen besaßen Antikörper gegen CMV und 84% von ihnen waren auch in der Proliferation positiv. In der Kontrollgruppe dagegen konnte bezüglich CMV, wie schon bei der Untersuchung des bereits beschriebenen Normalkollektivs, bestehend aus 104 gesunden Blutspendern, keine Korrelation zwischen zellulärer und humoraler Immunität aufgewiesen werden.

Die Rolle von CMV bei Lymphadenopathie-Syndromen oder AIDS ist bis jetzt noch nicht ganz geklärt. Es scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein, daß CMV an der Ätiologie von AIDS oder Kaposi Sarkom kausal beteiligt ist. In neuerer Zeit gab es keinerlei Hinweise, daß CMV-DNA in jedem Fall in Gewebe von Kaposi Sarkomen, Lymphknoten, Lymphozyten oder Granulozyten von AIDS-Patienten nachgewiesen werden müßte (Rüger et al., 1984). Vielmehr wurde

in Patienten mit AIDS oder in solchen Risikogruppen das humane T-Zell-Leukämie-Virus HTLV III gefunden. Es scheint allerdings möglich zu sein, daß CMV die zelluläre Immunkapazität supprimiert und somit den Organismus für opportunistische Erreger und Parasiten, möglicherweise auch für den ursächlichen Erreger von AIDS, zugänglich macht.

Bei einer weiteren Untersuchung von 15 männlichen Homosexuellen, die symptomfrei waren, konnten die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden. Es konnte auf Stimulation mit PHA, Con A, PPD und zwei viralen Antigenen HSV und CMV kein signifikanter Unterschied zu einer Kontrollgruppe gefunden werden. Im Gegensatz zu zwei Studien, die beschrieben, daß auf PWM-Stimulation die Proliferationswerte in Homosexuellen mit und ohne Lymphadenopathie höher lagen als bei Heterosexuellen (Kalden et al., 1983; Manger et al., 1984), waren bei den 15 symptomfreien männlichen Homosexuellen die Stimulationswerte bei einem statistischen Signifikanzniveau von $p = 0,01$ signifikant erniedrigt. Auch die Medianwerte lagen niedriger als die der Kontrollpersonen. Vergleichende Untersuchungen der humoralen und zellulären Immunität erbrachten, daß HSV betreffend bei Heterosexuellen und Homosexuellen eine gute Korrelation vorhanden war. CMV betreffend wurde nur bei Heterosexuellen eine weitgehende Korrelation gefunden, bei Homosexuellen dagegen nicht.

Als nächstes wurde mit Hilfe der Vollbluttechnik die Lymphoproliferation von Kolonkarzinom-Patienten prä- und postoperativ untersucht. Alle 108 Patienten wurden hinsichtlich ihrer zellulären Immunkapazität präoperativ untersucht, 50 Patienten wurden 10 Tage nach der Operation und 35 Patienten 3 Monate nach der Operation ausgetestet. Die Patienten wurden mit einer Kontrollgruppe, die aus 33 gesunden erwachsenen Blutspendern bestand, verglichen. Die Proliferationsfähigkeit wurde auf die drei Mitogen PHA, Con A und PWM, den T-Zell-Antikörper OKT 3 und das bakterielle Antigen Tuberculin PPD untersucht. Kolon-

karzinom-Patienten weisen eine allgemeine Schwäche des zellulären Immunsystems auf (Hilal et al., 1977; Wanebo et al., 1980; Doldi et al., 1984). Die Ergebnisse dieser Studie stimmen mit denen anderer Autoren insofern überein, daß periphere Blutlymphozyten von Kolonkarzinom-Patienten vor Behandlung auf das Mitogen PHA mit erniedrigten Stimulationswerten reagieren (Wanebo et al., 1980; Humphrey et al., 1981; Han et al., 1983). Es wurde weiterhin die Proliferationsfähigkeit auf OKT 3, Con A und PWM untersucht, und auch hier wurden im Vergleich zu gesunden Personen erniedrigte Proliferationswerte gefunden. In der Literatur wurde die Lymphozytenfunktion in der Regel mit Hilfe des Lymphozytentransformationstests nach Stimulation mit Mitogenen ausgetestet. Lauder und Bone (1973) beobachteten bei 21 Kolonkarzinom-Patienten im Vergleich zu 21 Kontrollen in der gleichen Altersverteilung anhand von Dosis-Wirkungskurven mit PHA eine signifikante Erniedrigung der Lymphoproliferation. Goldrosen et al. (1977) fanden in ihrer Untersuchung der PHA-induzierten Lymphoproliferation bei 76 Kolonkarzinom-Patienten und 29 Kontrollen eine altersbezogene und eine tumorassoziierte Abnahme der Immunkapazität in Krebspatienten. Wanebo et al. (1978/1980) beobachteten, daß das Ausmaß einer verminderten Immunreaktion streng von der jeweiligen Tumorart abhängig ist, wobei die Immunkapazität eine wichtige Rolle für das Tumorwachstum und die Prognose ist. Sie fanden in Kolonkarzinom-Patienten mit zunehmendem Krankheitsstadium eine zunehmende Depression der zellulären Immunität, die anhand von Dinitrochlorbenzol, Stimulation mit PHA und Lymphozytenzahl gemessen wurde (Wanebo et al., 1978; Wanebo et al., 1980). Markova et al. (1980) berichteten, daß verschiedene Parameter der zellulären Immunität mit dem Schweregrad der Krankheit in Zusammenhang stehen, obwohl die Schwankungsbreite jedes Parameters hoch ist.

Kolonkarzinome scheinen sich in ihrer immunologischen Interaktion mit dem Wirt sehr heterogen zu verhalten, da die lymphozytäre Funktion der Patienten

nicht immer mit dem Krankheitsgrad korreliert (Pihl et al., 1975). Wanebo und Pinsky (1978) legten dar, daß die mitogeninduzierte Proliferation in Tumorpatienten mit dem klinischen Stadium und mit dem histologischen Befund des jeweiligen Tumors verglichen werden sollte. Dies war aber in der vorliegenden Studie nicht möglich. Es wird aber darauf hingewiesen, daß die Patienten unbehandelt waren und daß das Ausmaß des Tumors im allgemeinen gering war.

Im Gegensatz dazu berichteten Wanebo et al. (1978), daß Patienten im fortgeschrittenen Stadium mit Lebermetastasen eine signifikante Korrelation zwischen der Überlebenschance, der Lymphoproliferation auf PHA und der Lymphozytenzahl aufwiesen. Im allgemeinen wiesen Kolonkarzinom-Patienten die gleiche lymphozytäre Depression auf wie Patienten mit anderen soliden Tumoren (Fujimoto et al., 1976; Hilal et al., 1977). Die Mechanismen der Depression der lymphozytären Reaktion von T-Zellen bei Krebspatienten sind bis heute noch nicht ganz aufgeklärt. Mehrere Autoren haben aber die verstärkte Anwesenheit von Suppressorzellen in Patienten mit neoplastischen Krankheiten, wie Karzinome der Brust und des Kolons beschrieben (Fujimoto et al., 1976; Waldman und Broder, 1977; Zembala et al., 1977; Broder et al., 1978). Es kann jedoch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß in vivo Serumfaktoren die Proliferation hemmen können. Der Effekt von Serumfaktoren von Krebspatienten auf lymphozytäre Funktionen wurde von Manousos et al. (1973) untersucht. Sie fanden nach Stimulation mit PHA eine signifikante Reduktion der Proliferation von normalen Lymphozyten, die in Gegenwart von Serum von Krebspatienten kultiviert worden waren, verglichen mit Lymphozyten kultiviert mit Kontrollseren. Hsu und Lo Gerfo (1972) beobachteten keinen Unterschied des Hemmeffekts von Plasma von Karzinompatienten verglichen mit Plasma von Kontrollpersonen auf lymphozytäre Funktionen. Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Es scheint noch ungelöst zu sein, ob die erniedrigte lymphozytäre Antwort auf den suppressiven Effekt des Tumors oder ob die Entwicklung und das Wachstum

des Tumors auf die verminderte immunologische Abwehrfähigkeit zurückzuführen ist. Der Prozentsatz der T-Zellen und die absolute Lymphozytenzahl wurde von einigen Autoren für normal, von anderen für erniedrigt gefunden (Klajman et al., 1980; Shafir et al., 1980). Wiederum andere zeigten, daß die Zahl der T-Zellen in Patienten etwas geringer war als in Kontrollpersonen. Bei den meisten der in dieser Arbeit untersuchten Patienten lag die Lymphozytenzahl im Normbereich.

Zwei Wochen nach der chirurgischen Resektion wurden nach Zugabe von PHA, Con A, PWM und OKT 3 niedrigere Stimulationswerte gefunden als vor der Operation. Nur mit PPD konnten ähnliche Werte erzielt werden. Die Abnahme der allgemeinen Immunkapazität nach der Operation mag, wie schon bei der Herzpatientengruppe beschrieben, die Folge der Tumorresektion, des operativen Traumas und der Immunsuppression sein. Eine zeitlich begrenzte Abnahme der zellulären Immunität nach Operationen wurde des öfteren in der Literatur schon beschrieben (Espanol et al., 1974; Salo, 1980). Übereinstimmend mit diesen Autoren konnte bei der Kolonkarzinom-Gruppe 3 Monate nach der Operation eine Normalisierung der zellulären Immunität nachgewiesen werden. Es erscheint wichtig, das Verhältnis von immunologischen Faktoren wiederholt auszutesten, obgleich es sein kann, daß nur in Patienten mit eingeschränkter Krankheit solch eine Aussagefähigkeit nachgewiesen werden kann. Bis jetzt ist die Zeit zu kurz, um die prognostische Relevanz immunologischer Tests bei Kolonkarzinom-Patienten bewerten zu können. In Verlaufsstudien über mehrere Jahre sollte geprüft werden, ob eine Korrelation zwischen Normalisierung der Immunreaktivität und Überlebensdauer einzelner Patienten besteht.

Desweiteren wurde die Lymphoproliferation und Interferonproduktion im Vollblut von Schizophreniepatienten untersucht. Es wurde die allgemeine zelluläre Immunkapazität gegenüber den Mitogenen PHA, Con A, PWM und die spezifische zelluläre Immunkapazität gegenüber den Antigenen PPD, HSV und

CMV ausgetestet. Zusätzlich wurden Induktionsversuche von Interferon mit PHA, Con A, NDV und CP durchgeführt. Die Ätiologie der Schizophrenie ist weitgehend unklar. Allerdings ist gesichert, daß am Auftreten schizophrener Psychosen genetische Faktoren beteiligt sind (Shields, 1978). Die erbliche Komponente ist eine wichtige, wenn auch nicht die einzige wirksame Bedingung. Es mehren sich Hinweise, wonach es möglich scheint, daß Viren bei der Entstehung eines Teils der Schizophrenieformen eine Rolle spielen. Malis (1948) postulierte als erster solch eine Hypothese, andere Autoren bestätigten dies (Crow, 1983; Morozov, 1983). Die individuelle Fähigkeit zur Interferonproduktion während einer Virusinfektion hat großen Einfluß auf den Verlauf der Infektion. So könnte ein Unterschied in der Produktionskapazität von Interferon ein wichtiger Faktor für die Virusätiologie der Schizophrenie sein.

Die Blutleukozyten von Schizophrenen und von normalen Blutspendern unterschieden sich in der Lymphoproliferation auf die T-Zell-Mitogene PHA und Con A; die Patientengruppe zeigte auf beide Mitogene signifikant erniedrigte Stimulationswerte. Nach Stimulation mit einem weiteren Mitogen PWM und einem bakteriellen Antigen PPD wurden dagegen bei beiden Gruppen keine Unterschiede beobachtet. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß nach Stimulation mit den gamma-Interferoninduzenten Con A und den alpha-Interferoninduzenten NDV und CP die Lymphozyten von schizophrenen Patienten weit weniger in der Lage waren, Interferon in vitro zu produzieren. Die PHA-induzierte IFN-gamma-Produktion war gegenüber Kontrollpersonen bei den Patienten ebenfalls erniedrigt, allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant.

Die beiden Personengruppen, die miteinander verglichen wurden - Patienten und Kontrollen -, unterschieden sich hauptsächlich in zwei Parametern: die Schizophrenie als Krankheit und die ärztliche Medikation. Somit konnten die Testergebnisse ein Effekt der Krankheit selbst oder die Folge der Medikamente,

meist Neuroleptika, sein. In dieser Studie konnten diese zwei verschiedenen Parameter nicht getrennt beobachtet werden, da es nicht möglich war, unbehandelte Patienten zu untersuchen. Hinsichtlich der mitogeninduzierten Lymphoproliferation haben Vartanian et al. (1978) eine Verminderung der PHA-Antwort gemessen. Im Gegensatz dazu wurden von Goldstein et al. (1980) beim Vergleich von 17 schizophrenen Patienten mit 25 Kontrollpersonen signifikant erhöhte Proliferationswerte auf PHA gefunden. Zusammen mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit kann die Vermutung geäußert werden, daß, wenn ein T-Zell-Defekt bei Schizophrenen bestehen sollte, dieser kein genereller T-Zell-Defekt ist. Bis zu diesem Zeitpunkt sind in der Literatur keine Daten über die Interferonproduktion von Leukozyten schizophrener Patienten beschrieben worden. Allerdings wurden in der Cerebrospinal-Flüssigkeit Schizophrener von einer Arbeitsgruppe Interferontiter gefunden (Libikova et al., 1979), von einer anderen dagegen nicht (Rinon et al., 1983). In einer Plazebo-kontrollierten Untersuchung von vier medikamentös behandelten schizophrenen Patienten fanden Cantell et al. (1980) nach Verabreichung von Interferon eine signifikante Verbesserung des Krankheitszustands. Es wird spekuliert, daß mit der Interferongabe ein IFN-Mangel bei den Patienten behoben wurde. Auch in dieser vorliegenden Arbeit wurde bei Schizophrenen eine signifikant verminderte Fähigkeit zur IFN-Produktion beobachtet. Damit wird postuliert, daß Schizophreniepatienten einen Defekt in der Interferonantwort aufweisen.

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Schizophreniepatienten sollte auch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Krankheit und einer Virusinfektion, speziell einer HSV- oder CMV-Infektion untersucht werden. Verschiedene Arbeitsgruppen haben berichtet, daß in Patienten mit neurologischen Krankheiten wie Multipler Sklerose, chronischer Myelopathie und subakuter skleröser Paraenzephalitis im Serum und in der Cerebrospinal-Flüssigkeit (CSF) häufig Antikörper

gegen Antigene im Gehirn gefunden wurden (Runtianinen et al., 1981). Auch eine virale Ätiologie dieser Krankheiten wurde angenommen (Gajdusek und Gibbs, 1973; Salmi et al, 1974). Der Hinweis auf eine kausale Rolle unkonventioneller Viren bei chronisch verlaufenden neurologischen Krankheiten ohne sichtbare Entzündungserscheinungen ließ auch bei einigen Schizophrenieformen die Frage einer Virusinfektion aufkommen (Crown, 1983; Rinon, 1983). Zusätzlich zur Virushypothese der Schizophrenie können immunologische Faktoren eine Rolle spielen. Mehrere Autoren fanden bei Schizophrenen im Serum und in der CSF erhöhte Antikörpertiter speziell gegen HSV oder CMV (Gotlieb-Stematsky et al., 1981). Andere Arbeitsgruppen jedoch konnten dies nicht bestätigen. Torrey und Peterson (1973) fanden keinen Unterschied der Antikörpertiter im Serum von Schizophrenen und Kontrollpersonen.

Rinon et al. (1979a,b) fanden ebenfalls keine unterschiedlichen Titer; auch in der hier beschriebenen Studie waren die Titer gleich. Weiterhin konnte kein Unterschied in der zellulären Immunantwort auf HSV und CMV zwischen Kontrollen und Schizophrenen festgestellt werden. Die Lymphozyten beider Gruppen wurden durch diese beiden viralen Antigene gleichermaßen stimuliert. Die vorliegenden Ergebnisse können den Verdacht einer Virushypothese für die Schizophrenie nicht festigen. Sie stehen jedoch nicht im Gegensatz zu den bisher in dieser Arbeit gefundenen Daten der Induktion von Interferon, durch die gezeigt worden ist, daß Leukozyten von Schizophrenen nach Stimulation mit PHA, Con A, NDV und CP weniger Interferon produzieren als Kulturen von normalen Blutspendern. Die Erkenntnisse der vorliegenden Studie können die Möglichkeiten einer chronischen bzw. latenten Virusinfektion der CNS oder die Hypothese, daß bei der Schizophrenie das Virus in einem zerebralen dominanten Gen enthalten ist, nicht ausschließen (Crow, 1984). Die Fähigkeit des einzelnen Menschen, Interferon zu produzieren, nimmt jedoch einen wichtigen Einfluß auf den Verlauf einer

Virusinfektion, z.B. könnte IFN die Ausbreitung einer Infektion vom Blut ins Gehirn und eine subklinische Virusinfektion in der CSF kontrollieren.

Die Sarkoidose, auch Morbus Boeck genannt, ist eine generalisierte, granulomatöse Erkrankung, die vor allem die tracheobronchialen Lymphknoten und die Lungen befällt. Das morphologische Bild ist dem der Tuberkulose sehr ähnlich. Das Sarkoidgranulom besteht aus einer knötchenförmig geordneten kompakten Zellansammlung von Makrophagen, Epitheloid- und Riesenzellen, denen B- und T-Lymphozyten und Fibroblasten zugeordnet sind. Die beherrschende Zellform des Granuloms bilden Epitheloidzellen. Gegenwärtig läßt sich nicht sicher entscheiden, unter welchen Bedingungen sich Epitheloidzellen bilden. Untersuchungen sprechen dafür, daß sich Makrophagen nach der Phagozytose wahrscheinlich alterierter Lymphozyten in Epitheloidzellen umwandeln (Fuse et al., 1980), so daß es sich hier um immunkompetente Zellen handelt. Die entzündliche Erkrankung läuft in verschiedenen Stadien ab. Nach einer zellreichen floriden Form entwickelt sich eine zunehmende Vernarbung, die die klinische Symptomatik entscheidend prägt. In den Randabschnitten beginnend, kommt es zu einer Fibroblastenaktivierung und -proliferation mit einer Neubildung von Kollagenfasern, die sich in das Granulom hinein entwickelt und zur vollständigen narbigen Umwandlung der Granulome führt.

Sarkoidose kommt auf der ganzen Welt vor; besonders häufig tritt sie auf der westlichen Hemisphäre auf, dagegen ist sie selten in Asien, mit Ausnahme von Japan. Es ist unklar, ob das Auftreten der Sarkoidose an der unterschiedlichen Empfänglichkeit der Menschen oder an der unterschiedlichen Sorgfalt der Röntgenuntersuchungen liegt. Gesichert ist allerdings, daß die schwarze Rasse in Amerika häufiger an Sarkoidose erkrankt und schwerere Verlaufsformen aufweist als eine weiße Bevölkerung (De Remee, 1983).

Obwohl umfangreiche biochemische und epidemiologische Untersuchungen vorliegen, konnte die Substanz, die diese Reaktion auslöst, nicht ermittelt werden.

Angeschuldigt wurden Viren, Pilze, Protozoen und Bakterien. Diskutiert wird eine atypische Mykobakteriose, aber auch inhalierte organische und anorganische Mineralien werden vermutet. Auch Beobachtungen einer familiären Häufung der Erkrankung stützen den Verdacht, daß eine erbliche Komponente für die Entwicklung des Krankheitsbildes gegeben sein muß. Bei der Auslösung und Unterhaltung des protrahiert ablaufenden chronischen Entzündungsprozesses kommt der Wechselwirkung zwischen Lymphozyten und Makrophagen die entscheidende Bedeutung zu. Zur Auslösung der Reaktion ist wahrscheinlich nur eine kurzzeitige Aktivität eines Agens notwendig. Der Prozeß läuft dann in einem geschlossenen System unabhängig von dem auslösenden Agens protrahiert ab. Wahrscheinlich wird das Agens in der Initialphase rasch so weit abgebaut, oder es ist in so niedrigen Konzentrationen wirksam, daß es mit den heutigen technischen Möglichkeiten weder morphologisch noch biochemisch faßbar ist (Übersicht bei Morgenroth, 1983).

Vielfältige Untersuchungen haben gezeigt, daß die Sarkoidose mit einer verminderten Aktivität gewisser zellulärer Reaktionen und einer gesteigerten Aktivität gewisser humoraler Reaktionen einhergeht. Am Krankheitsherd selbst konnte die pathologische Anatomie zeigen, daß die Alveolitis und die Granulome durch vermehrte Ansammlung von T-Helfer Lymphozyten sowie Makrophagen und den daraus hervorgehenden Epitheloid- und Riesenzellen aufgebaut werden. Zellkonzentrationen zeigten, daß bei der aktiven Sarkoidose gegenüber Kontrollen die Makrophagen 3,5fach erhöht, die Lymphozyten 40fach, die T-Helfer-Zellen 90fach, die T-Suppressorzellen 16fach und die B-Zellen 20fach erhöht sind. Dagegen fand man in der aktiven Phase der Krankheit im peripheren Blut eine Lymphopenie, die Konzentration der Lymphozyten fiel auf 60-65% ab. Gleichzeitig war die Zahl der aktivierten T-Zellen erhöht, die Suppressorzellen überwogen. Es stellte sich die Frage, inwieweit die peripheren Blutlymphozyten von Sarkoidose-

patienten in der Lage waren, die zelluläre Immunität aufrecht zu erhalten. Die Ergebnisse über die Stimulierbarkeit der peripheren Lymphozyten anhand des Lymphozytentransformationstests sind in der Literatur nicht einheitlich (Übersicht bei Yoshida et al., 1979; Goodwin et al., 1979; Daniele et al., 1980). In der Mehrzahl der Untersuchungen war die Stimulierung durch Mitogene geringer. Einerseits wurde eine erniedrigte Stimulierbarkeit durch PHA beobachtet (Topilsky et al., 1972; Kataria et al., 1973; Haskovcova et al., 1976; Cummiskey et al., 1977; Selroos et al., 1982). Andererseits wurde wiederum kein Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten gefunden (Horsmanheimo und Virolainen, 1974; Mangi et al., 1974). Auch bei den hier in dieser Arbeit beschriebenen Patienten konnten im Vergleich zu den Kontrollen keine singifikanten Unterschiede in der Proliferationshöhe auf PHA gefunden werden.

Im Gegensatz dazu reagierten die Patienten auf Con A und auf PWM mit signifikant erniedrigten Werten, wogegen die Reaktion auf PPD wiederum bei beiden Gruppen gleich war. Selroos et al. (1982) fanden auf Con A keinen Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten, auf PWM beschrieben sie ebenfalls signifikant geringere Stimulationswerte, und auch die Reaktion auf PPD war erniedrigt. Diese Situation wurde auch von Haskovcova et al. (1976) gefunden. Andererseits fanden Cummiskey et al. (1977) wiederum keinen Unterschied in der Stimulierbarkeit auf PPD. Allerdings wurden in der Literatur die Untersuchungen in verschiedenen Krankheitsstadien gemacht, in der vorliegenden Studie war es nicht möglich gewesen, die Patienten nach Krankheitsverlauf aufzutrennen und auszutesten. Dies mag ein wesentlicher Gesichtspunkt für die unterschiedlichen Stimulationsergebnisse sein. Selroos et al. (1982) zeigten allerdings auf, daß die Reaktion auf PHA in jedem Krankheitsstadium signifikant erniedrigt war. Ähnliches zeigten sie auch für PPD, hier war eher noch ein Abfall der Reaktivität zu erkennen. Hinsichtlich PWM war beim Übergang der Krankheit in das chronische

Stadium ein Anstieg der Lymphoproliferation zu verzeichnen. Die Suppression der Mitogenstimulation geht offenbar von den Monozyten aus (Goodwin et al., 1979), die auch die polyklonale Aktivierung von B-Zellen hemmen (Katz und Fauci, 1978). Teilweise abhängig von der Krankheitsaktivität, teilweise unabhängig davon, sind verschiedene Inhibitoren, wie Serumfaktoren und von Monozyten und Makrophagen sezernierte Hemmstoffe für die Lymphozytenstimulierung durch Mitogene und Antigene nachgewiesen worden (Mangi et al., 1974; Semenzato et al., 1978). Die B-Zell-Funktion steigt mit fortschreitendem Krankheitsverlauf wieder an, was mit der Zunahme der B-Lymphozyten im peripheren Blut einhergeht. Die T-Zell-Funktionen scheinen aber erniedrigt zu bleiben, obwohl die Anzahl der zirkulierenden T-Lymphozyten zunimmt. Dies mag auf ein Ungleichgewicht zwischen Suppressor- und Helfer-T-Lymphozyten zurückzuführen sein.

Obwohl durch verschiedene Studien die Annahme ausgeschlossen werden konnte, daß die Sarkoidose auf einer Virusinfektion beruht, sollte bei der Patientengruppe doch die zellvermittelte Reaktion auf HSV und CMV untersucht werden. Die Proliferationsergebnisse zeigten, daß nach Stimulation mit CMV mit der Kontrollgruppe vergleichbare Werte erzielt wurden. Nach Stimulation mit HSV dagegen wurden bei Sarkoidosepatienten signifikant erniedrigte Werte gefunden, auch der Medianwert der Proliferationsraten war deutlich erniedrigt.

In der Literatur finden sich wenige Angaben über die Untersuchung der zellvermittelten Immunität gegenüber HSV und CMV. Wasserman et al. (1975) fanden bezüglich HSV keinen Unterschied der Lymphozytentransformation zwischen Patienten und Kontrollen. Eingehend untersucht dagegen wurde die humorale Immunität bei Sarkoidosepatienten. Auffällig war durchweg eine Hyperreaktivität des humoralen Systems. Es wurden außergewöhnlich hohe Serumantikörpertiter gegen Mikroorganismen wie Mykoplasmen (Horsmanheimo et al., 1978) und gegen Viren wie EBV, HSV, Röteln, Masern und Parainfluenza gefunden (Byrne et al.,

1974). Allerdings war die Anzahl der seropositiven bzw. seronegativen Individuen bei Patienten wie bei Kontrollen ungefähr gleich, die seropositiven Patienten unterschieden sich nur im signifikant höheren Serumtiter auf die jeweiligen Antigene. Im Gegensatz zu HSV waren die Antikörpertiter gegen CMV bei den seropositiven Patienten gegenüber den Kontrollen nicht erhöht.

Die Titerhöhe in dieser hier beschriebenen Studie wurde nicht berücksichtigt, es kann aber die Aussage gemacht werden, daß auch hier die Verteilung der Seronegativen bzw. Seropositiven bei Patienten wie bei Kontrollen gleich ist. Auffällig war, daß die Korrelation zwischen Lymphoproliferation und humoraler Immunität für beide getesteten Antigene HSV und CMV in der Kontrollgruppe wesentlich besser war als in der Patientengruppe. Ähnliche Untersuchungen betreffs HSV wurden 1975 von Wasserman et al. gemacht. Diese Arbeitsgruppe verglich die Lymphozytentransformation mit dem Vorhandensein von zirkulierenden Antikörpern gegen HSV, gemessen in der Komplementbindungsreaktion und im Neutralisationstest. Mit diesem letzteren Test wurde eine größere Zahl Positiver entdeckt als mit dem KBR. Auch war die Titerhöhe im KBR wesentlich geringer. Wasserman et al. fanden eine auffallende Korrelation zwischen Lymphozytentransformation und neutralisierenden Antikörpertitern. Patienten mit hohem Antikörperspiegel wiesen auch hohe Proliferationsraten auf. Es wurde aber kein Zusammenhang zwischen HSV-Infektion und Sarkoidose entdeckt. Wahren et al. (1971) testeten ebenfalls Seren von Sarkoidosepatienten gegen verschiedene Viren aus und fanden allerdings im Hemagglutinations-Test nur auf HSV und CMV höhere Antikörpertiter; da aber die Anzahl der seropositiven Proben gering war, wurden keine genaueren Untersuchungen gemacht. Sie nahmen an, daß nichtspezifische Mechanismen am Auftreten von hohen Antikörpertitern gegen verschiedene Herpesviren wie EBV, CMV und HSV bei Sarkoidosepatienten beteiligt sind. Hirshaut et al. (1970), Wahren et al. (1971) und Byrne et al. (1974) waren

die ersten, die eine Hyperreaktivität des humoralen Systems gegenüber verschiedenen Viren bei der Sarkoidose beobachteten. In einigen Untersuchungen wurden im Serum von Patienten gefunden, daß die hauptsächlichen Immunglobuline IgA, IgG und IgM erhöht vorliegen, und daß IgG den höchsten Spiegel aufweist (James et al., 1975). In einer späteren Studie fanden diese Autoren (1982), daß die B-Zellen durch T-Helfer-Zellen stimuliert werden und somit alle Klassen der Immunglobuline im Serum erhöht vorkommen. Neben den schon erwähnten außergewöhnlich hohen Antikörpertitern gegen verschiedene Mikroorganismen und Viren scheinen bestimmte B-Zellklone zum Ausdruck zu kommen, die die Produktion von Antikörpern gegen Wirtsantigene veranlassen. Desweiteren wurde ein gehäuftes Vorkommen von Autoantikörpern wie Rheumafaktoren (Oreskes und Siltzbach, 1968), antinukleären Antikörpern (Veien et al., 1978) und Antikörpern gegen T-Zellen gefunden (Daniele und Rowlands, 1976). Eine weitere Abweichung des humoralen Systems von Gesunden ist das Auftreten von zirkulierenden Immunkomplexen bei manchen Sarkoidosepatienten. Die Rolle dieser Immunkomplexe bei der Pathogenese der Sarkoidose ist allerdings unklar, es wird aber diskutiert, daß sie an der Entstehung der Granulome beteiligt sind (Hedfors und Norberg, 1974; Hedfors, 1976). Zusammenfassend scheint bei der Sarkoidose die humorale Immunität im Gegensatz zum zellulären Immundefizit funktionell zu überwiegen. Obwohl die Sarkoidose mit einer Abnahme der Gesamtzahl der zirkulierenden T-Zellen assoziiert ist, ist die Zahl der aktivierten T-Zellen im peripheren Blut erhöht.

Aus den Ergebnissen aller in dieser Arbeit untersuchten Patientengruppen ergibt sich der Schluß, daß mit dieser Arbeit ein Vollbluttestsystem entwickelt wurde, welches für die Austestung der allgemeinen zellulären Immunität gegenüber Mitogenen und der spezifischen zellulären Immunkapazität gegenüber viralen und bakteriellen Antigenen gleichermaßen geeignet ist. Dieser Test bringt gegen-

über den herkömmlichen Methoden, die mit isolierten Lymphozyten durchgeführt werden, entscheidende Vorteile mit sich. Die benötigte Blutmenge ist gering, dies ist wichtig in der Pädiatrie und bei Patienten mit hohem Blutverlust, und es sind nur wenig Materialien erforderlich. Auch braucht das Blut nicht in seine Bestandteile aufgetrennt zu werden, und es muß kein Fremdserum eingesetzt werden, d.h., die In-vivo-Verhältnisse der zellulären Bestandteile des Blutes bleiben erhalten. Desweiteren besteht die Möglichkeit, die spezifische zelluläre Immunität und die allgemeine Immunkapazität gleichzeitig zu bestimmen; in Parallelansätzen aus der gleichen Blutprobe kann auch die Interferonproduktion gemessen werden. Diese Vorteile bringen gegenüber den bisherigen Verfahren auch große Zeitvorteile mit sich, so daß Blut vieler Patienten an einem Tag untersucht werden kann.

Wie aus den Versuchen dieser Dissertation hervorgeht, lassen sich die Ergebnisse, die mit der Vollblutmethode erzielt wurden, mit den Ergebnissen aus der Literatur, die nach den herkömmlichen Methoden gefunden wurden, in Übereinstimmung bringen. Das veranlaßt zu der Annahme, daß dieser Vollbluttest geeignet ist, in der Routinediagnostik eingesetzt werden zu können, um die allgemeine wie auch die spezifische zelluläre Immunitätslage bei verschiedenen Patientengruppen zu untersuchen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Generalisierte Infektionen durch HSV und CMV kommen häufig bei Patienten vor, deren Immunsystem entweder noch nicht ausgereift ist, so bei Neugeborenen, oder deren Immunsystem in seiner Funktion beeinträchtigt ist, z.B. bei Bluttransfusionen, Immundefekten, Transplantationen, bei Therapie mit Immunsuppressiva und bei malignen Tumoren. Neben der humoralen Immunität kommt bei der Abwehr von Infektionen durch diese Herpesviren der zellulären Immunität eine entscheidende Bedeutung zu. Klinische Untersuchungen, die nur die humorale Immunitätslage berücksichtigen, können deswegen nur einen unzureichenden Einblick in die Pathogenese solcher Infektionen geben. Die bisherigen Methoden zur Erfassung der zellulären antiviralen Immunabwehr sind jedoch für den Einsatz in der Routinediagnostik nicht geeignet.

Es sollte ein Testsystem entwickelt werden, welches in klinischen Laboratorien angewendet werden kann und welches als Vollbluttechnik bezeichnet wurde. Dieses System sollte sowohl für die mitogen- als auch für die antigeninduzierte Lymphozytenproliferation verwendbar sein. Das entwickelte Testsystem ist vergleichsweise zu den bisherigen Methoden einfach durchzuführen und vermeidet die bekannten Nachteile, insbesondere den hohen Material- und Zeitaufwand. Auch wird durch die Nichtauftrennung des Vollbluts eine Verschiebung der Leukozytensubpopulation verhindert; die In-vivo-Verhältnisse der zellulären Bestandteile des Blutes bleiben so erhalten. Diese Vollblutmethode wurde an einer großen Gruppe gesunder erwachsener Blutspender etabliert. Die Lymphozyten aller Spender reagierten sehr gut auf verschiedene Mitogene. Die Lymphozyten der meisten Spender reagierten auch auf HSV, auf CMV zeigten aber nur eine begrenzte Anzahl der Spender eine positive Reaktion. Parallel dazu wurden Antikörper gegen CMV und HSV mit der ELISA-Technik bestimmt. Für HSV wurde

eine weitgehende Korrelation serologischer Daten und Lymphoproliferationsergebnisse gefunden. Für CMV dagegen konnte keine klare Übereinstimmung erzielt werden. Diese Dissonanz kann aber aufgrund der anderen Stimulationsdaten nicht mit einer insgesamt schlechten zellulären Immunitätslage korreliert werden. Auch kann nicht von einer Schwäche des Testsystems ausgegangen werden, da viele Spender, die nicht auf CMV reagierten, gute Ergebnisse auf die Antigene PPD oder HSV lieferten, und Spender, die im Vollblut auf CMV negativ reagierten, waren auch im konventionellen Lymphoproliferationstest negativ. Desweiteren wurde auch mit über Saccharosegradienten aufgereinigten CMV-Virionen und mit einem zweiten CMV-Stamm keine weiteren positiven Probanden entdeckt. Es wird vermutet, daß dieses Phänomen auf einer Dissoziation zwischen humoraler und zellulärer Immunität beruht und zwar insofern, daß die zelluläre Immunität nur für eine bestimmte Zeit nach einer Infektion gemessen werden kann, während die humorale Immunität wesentlich längere Zeit bestehen bleibt.

Mit dieser Vollbluttechnik wurden verschiedene Patientengruppen untersucht, bei denen es wichtig ist, Kenntnisse über deren zelluläre Immunkapazität zu erhalten. Es waren Patienten, die sich einer Operation am offenen Herzen unterzogen hatten, männliche Homosexuelle mit Lymphadenopathie-Syndrom, Kolonkarzinom-Patienten, Schizophrenie-Patienten und Sarkoidose-Patienten. Diese Patientengruppen wurden ausgewählt, weil bei all diesen Krankheitsbildern in der Literatur Hinweise für Defekte in der zellulären Immunkapazität bestanden. Bei all diesen Personengruppen hat sich die hier in dieser Arbeit vorgestellte Vollblutmethode für geeignet gezeigt, schnell und einfach die allgemeine zelluläre Immunitätslage gegenüber unspezifischen Mitogenen, aber auch die spezifische zelluläre Immunreaktion gegenüber viralen und bakteriellen Antigenen zu erfassen.

Abschließend seien hier nochmals die Vorteile der Vollbluttechnik gegenüber den herkömmlichen Methoden aufgezeigt:

- wenig Blut ist erforderlich, dies ist vor allem in der Pädiatrie wichtig
- wenig Materialien sind erforderlich
- man benötigt keinen Zusatz von Fremdserum
- die In-vivo-Verhältnisse der zellulären Bestandteile des Blutes bleiben erhalten
- man kann eine größere Zahl Patienten an einem Tag austesten
- die Möglichkeit einer gleichzeitigen Bestimmung der spezifischen zellulären Immunität gegen Viren und Bakterien und der allgemeinen Immunkapazität ist gegeben und
- parallel zur Lymphoproliferation kann die Interferonproduktion bestimmt werden.

Somit wurde mit diesem Vollbluttest eine Methode entwickelt, die durch ihre Einfachheit und ihre Zuverlässigkeit und Standardisierbarkeit für den Einsatz in der Routinediagnostik geeignet ist.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Alexander, E., Sanders, S. und Braylam, R. (1976). Reported difference between human T and B cells surface morphology is an artefact. Nature 261: 239.

Arenzana-Seisdedos, F. und Virelizier, J.L. (1983). Interferons as macrophage-activating factor. II. Enhanced secretion of interleukin 1 by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. Eur. J. Immunol. 13: 437.

Bang, F.B. (1978). Genetics of resistance of animals to viruses. I. Introduction and studies in mice. Adv. Virus Res. 23: 269.

Barile, M.F. (1981). Mycoplasma infections of cell cultures. Isr. J. med. Sci. 17: 555.

Beck, J., Brunner, H., Marcucci, F., Wietzerbin, J. und Kirchner, H. (1982). Induction of interferon by mycoplasmas in mouse spleen cell cultures. J. Interferon Res. 2: 31.

Berenbaum, M.C., Fluck, P.A. und Hurst, N.P. (1973) Depression of lymphocyte respones after surgical trauma. Br. J. Exp. Path. 54: 597.

Betts, R.F., Freeman, R.B., Douglas, R.G., Talley, T.E. und Rundell, B. (1975). Transmission of cytomegalovirus infection with renal allograft. Kidney Int. 8: 385.

Beutner, K.R., Morag, A., Deibel, R., Morag, B., Raiken, D. und Ogra, P.L. (1978). Strain-specific local and systemic cell-mediated immune responses to cytomegalovirus in humans. Infect. Immun. 20: 82.

Biberfeld, G. und Gronowicz, E. (1976). Mycoplasma pneumoniae is a polyclonal B cell activator. Nature 261: 238.

Böyum, A. (1974). Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. Tissue Antigen 4: 269.

Braun, R. und Kirchner, H. (1986): Herpes simplex Virus induzierte Krankheiten. Dtsch. Ärzteblatt. Im Druck.

Broder, S., Muul, L. und Waldman, T.A. (1978). Suppressor cells in neoplastic disease. J. Natl. Cancer Inst. 61: 5.

Brodeur, B.R. und Merigan, T.C. (1974). Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice. J. Immunol. 113: 1319.

Bröcker, E.B. und Macher, E. (1981) Der Einfluß von Narkose und Operation auf das Immunsystem. Klin. Wochenschr. 59: 1297.

Burnett, F.M. (1959). The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press, New York, London.

Byrne, E.B., Evans, A.S., Fouts, D.W. und Israel, H.L. (1973). A seroepidemiological study of Epstein-Barr Virus and other viral antigens in sarcoidosis. Am. J. Epidemiol. 97: 355.

Byrne, E.B., Evans, A.S., Fouts, D.W. und Israel, H.L. (1974). Serological hyperreactivity to Epstein-Barr virus and other viral antigens in sarcoidosis. In: Iwai, K., Hosoda, Y., eds. Proceedings of the VI. International Conference on Sarcoidosis. University Park Press, Baltimore, pp. 218-225.

Cantell, K., Pulkkinen, E., Elosuo, R. und Suominen, J. (1980). Effect of interferon on severe psychiatric diseases. Ann. Clin. Res. 12: 131.

Cerottini, J.C. und Brunner, K.T. (1974). Cell mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. 17: 67.

Cole, B.C., Overall, J.C., Lombardi, P.S. und Glasgow, L.A. (1976). Induction of interferon in ovine and human lymphocyte cultures by mycoplasmas. Infect. Immun. 14: 88.

Cole, B.C., Aldrige, K.E. und Ward, J. (1977). Mycoplasma-dependent activation of normal lymphocytes: mitogenic potential of mycoplasmas for mouse lymphocytes. Infect. Immun. 18: 393.

Copperman, R. und Morton, H.E. (1966). Reversible inhibition of mitosis in lymphocyte cultures by non-viable mycoplasma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123: 790.

Crow, T.J. (1983). Is schizophrenia an infectious disease? Lancet I: 173.

Crow, T.J. (1984). A re-evaluation of the viral hypothesis. Is psychosis the result of retroviral integration at a side close to the cerebral dominance gene?. Br. J. Psychiatry 145: 243.

Cullen, B.F. und Van Belle, G. (1975). Lymphocyte transformation and changes in leukocyte count: Effects of anaesthesia and operation. Anaesthesiol. 43: 563.

Cummiskey, J.M., McLaughlin, H. und Keelan, P. (1977). Lymphocytes in sarcoidosis: A clinical correlation. Ann. Allerg. 39: 367.

Daniele, R.P. und Rowlands, D.T. Jr. (1976). Antibodies to T cells in sarcoidosis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 278: 88.

Daniele, R.P., Dauber, J.H. und Rossman, M.D. (1980). Immunologic abnormalities in sarcoidosis. Ann. Intern. Med. 92: 406.

De Ley, M., Van Damme, J., Claeys, H., Weening, H., Heine, J.W., Billiau, A., Vermylen, C. und DeSomer, P. (1980). Interferon induced in human leukocytes by mitogens: production, partial purification and characterization. Eur. J. Immunol. 10: 877.

DeMarchi, J.M. und Kaplan, A.S. (1977). The role of defective cytomegalovirus particles in the induction of host cell DNA synthesis. Virology 82: 93.

DeRemee, R.A. (1983). Klinik, Diagnostik und Therapie bei Sarkoidose der Atmungsorgane. Prax. Klin. Pneumol. 37: 519.

Detels, R., Visscher, B.R., Fahey, J.L., Schwartz, K., Greene, R.S., Madden, D.L., Sever, J.L. und Gottlieb, M.S. (1984). The relation of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus antibodies to T cell subsets in homosexually active men. J. Am. Med. Assoc. 251: 1719.

Diosi, P., Moldovan, E. und Tomescu, N. (1969). Latent cytomegalovirus infection in blood donors. Br. Med. J. 4: 660.

Doldi, K., Leroux, M., Kirchner, H., Bienzle, V., Ritter, K. und Kalden, J.R. (1985). Proliferative responses to human cytomegalovirus in lymphocyte cultures of male homosexuals. J. Clin. Lab. Immunol. 17: 111.

Doldi, K., Manger, B., Koch, B., Riemann, J., Hermanek, P. und Kalden, J.R. (1984). Spontaneous suppressor cell activity in the peripheral blood of patients with malignant and chronic inflammatory bowel diseases. Clin. Exp. Immunol. 55: 655.

Donahoe, R.M. und Huang, K.Y. (1976). Interferon preparations enhance phagocytosis in vivo. Infect. Immun. 13: 1250.

Dowling, J.N., Saslow, A.R., Armstrong, J.A. und Ho, M. (1976). Cytomegalovirus infection in patients receiving immunosuppressive therapy for rheumatologic disorders. J. Infect. Dis. 133: 399.

El Araby, J.J., Chernesky, M.A., Rowls, W.E. und Dent, P.B. (1978). Depressed herpes simplex virus-induced blastogenesis in individuals with severe recurrent herpes infections. Clin. Immunol. Immunopathol. 9: 253.

Epstein, M.A., Achong, B.G. und Barr, Y.M. (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet 1: 702.

Espanol, T., Todd, G.B. und Soothill, J.T. (1974). The effect of anaesthesia on the lymphocyte response to PHA. Clin. Exp. Immunol. 18: 73.

Faix, R.G., Zwieg, S.E., Kummer, J.F., Moore, D. und Lang, D.J. (1983) Cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity in lower-socioeconomic-class adolescent women with local cytomegalovirus infections. J. Clin. Microbiol. 17: 582.

Fanger, M.W., Pelley, R.P. und Reese, A.L. (1972). In vitro demonstration of two antigenically-distinct rabbit lymphocyte populations. J. Immunol. 109: 204.

Fischer, E., Lenhard, V., Seifert, P., Kluge, A. und Johannsen, R. (1980). Blood transfusion-induced suppression of cellular immunity in man. Hum. Immunol. 3: 187.

Friedman, R.M. und Cooper, H.L. (1967). Stimulation of interferon production in human lymphocytes by mitogen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125: 901.

Fujimoto, S., Greene, M.J. und Sehon, A.H. (1976). Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunosuppressor cells in tumor bearing hosts. J. Immunol. 116: 791.

Fuse, Y., Imazeki, N., Asakawa, M., Hiraga, Y., Shimeda, Y., Mikami, R., Osada, H. und Hayakawa, K. (1980). Ultrastructural study of sarcoid granulomas-lymphocyte alterations within sarcoid granulomas. In: Jones Williams, W., Davies, B.H., eds. 8th Int. Conf. on Sarcoidosis and Other Granulomatous Diseases. Alpha Omega Publ. Limit. Cardiff, 19.

Gärtner, L., Wilhelm, J.A. und Czieschnek, R. (1982). In vitro stimulation of lymphocytes by different strains of cytomegalovirus. Med. Microbiol. Immunol. 171: 53.

Gajdusek, D.C. und Gibbs, C.J. Jr. (1973): Subacute and chronic diseases by atypical infections with unconventional viruses in aberrant host. In: Perspectives in Virology, Pollard, M. et al., eds. Academic Press, New York 8: 279.

Ginsberg, H.S. (1980). Herpesviruses - general characteristics. In: Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., eds. Microbiology Including Immunology and Molecular Genetics. 3rd ed., Harper & Row, Publishers, Inc. Philadelphia, 1062.

Giraldo, G., Beth, E., Henle, W., Henle, G., Miké, V., Safai, B., Huraux, J.M., McHardy, J. und De Thé, G. (1978). Antibody patterns to herpes viruses in Kaposi's sarcoma: II. Serological association of American Kaposi's sarcoma with cytomegalovirus. Int. J. Cancer 22: 126.

Giraldo, G., Beth, E. und Huang, E.S. (1980). Kaposi's sarcoma and its relationship to cytomegalovirus (CMV): III. CMV DNA and CMV early antigen in Kaposi's sarcoma. Int. J. Cancer 26: 23.

Giraldo, G., Beth, E., Kourilsky, F.M., Henle, W., Miké, V., Huraux, J.M., Andersen, H.K., Gharbi, M.R., Kyalwazi, S.K. und Puissant, A. (1975). Antibody patterns to herpes viruses in Kaposi's sarcoma: Serological association of European Kaposi's sarcoma with cytomegalovirus. Int. J. Cancer 15: 839.

Goldrosen, M.H., Han, T., Jung, O., Smoley, J. und Holyoke, E.D. (1977). Impaired lymphocyte blastogeneic response in patients with colon adenocarcinoma: Effects of disease and age. J. Surg. Oncol. 9: 229.

Goldstein, A.L., Rossio, J. und Kolyaskina, G.J. (1980). Immunological components in schizophrenia. In: Perspective in Schizophrenia Research. Baxter, C., Melnechuk, T., eds. Raven Press, New York.

Goodwin, J.S., De Horatius, R., Israel, H., Peake, G.T. und Messner, R.P. (1979). Suppressor cell function in sarcoidosis. Ann. Intern. Med. 90: 167.

Gotlieb-Stematsky, T., Zonis, J., Arlazoroll, A., Mozes, T., Signal, M. und Szekely, A.G. (1981). Antibodies to Epstein-Barr virus, herpes simplex type 1, cytomegalovirus and measles virus in psychiatric patients. Arch. Virol. 67: 333.

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.O., Fan, P.T., Wolf, R.A. und Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence for a new acquired cellular immunodeficiency. N. Eng. J. Med. 305: 1425.

Graham, G.L., Veldhuisen, G. und Wilkie, N.M. (1973). Infectious herpes virus DNA. Nature New Biol. 245: 265.

Greaves, M.F. (1975). Scratching the surface. In: Proc. ninth Leucocyte Culture Conference, Immune Recognition. Academic Press, New York, San Francisco, London, pp. 3-19.

Han, T., Nemoto, T., Ledesma, E.J. und Bruno, S. (1983). Enhancement of T lymphocyte proliferative response to mitogens by indomethacin in breast and colorectal cancer patients. Int. J. Immunopharmac. 5: 11.

Hanshaw, J.B., Niederman, J.C. und Chessin, L.N. (1972). Cytomegalovirus macroglobulin in cell-associated herpesvirus infections. J. Infect. Dis. 125: 304.

Haskovcova, H., Hausner, P., Altmann, V. und Votava, V. (1976). Zellvermittelte Immunität bei Sarkoidose-Kranken. Allerg. Immunol. 22: 123.

Hedfors, E. (1975). Immunological aspects of sarcoidosis. Scand. J. Respir. Dis. 56: 1.

Hedfors, E. und Norberg, R. (1974). Evidence for circulating immune complexes in sarcoidosis. Clin. Exp. Immunol. 16: 493.

Hekker, A.C., Brand-Saathof, B., Vis, J. und Meijers, R.C. (1929). Indirect immunofluorescence test for detection of IgM antibodies to cytomegalovirus. J. Infect. Dis. 140: 596.

Henle, W., Henle, G., Ho, H.C., Burtin, B., Caching, Y. und Klein, G. (1970). Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasmas, and control groups. J. Natl. Cancer Inst. 44: 225.

Herberman, R.B. und Holden, H.T. (1978). Natural cell-mediated immunity. Adv. Cancer Res. 27: 305.

Hilal, E.Y., Wanebo, H.J., Pinsky, C.M., Middleman, P., Strong, E.W. und Oettgen, H.F (1977). Immunologic evaluation and prognosis in patients with head and neck cancer. Am. J. Surg. 134: 469.

Hirsch, M.S. (1984). Cytomegalovirus leukocyte interactions. Birth defects: Original Article Series 20: 161.

Hirshaut, Y., Glade, P. und Viera, L.O. (1970). Sarcoidosis, another disease associated with serologic evidence for herpes-like virus infection. N. Eng. J. Med. 283: 502.

Ho, M. (1982). Cytomegalovirus-biology and infection. Plenum Press, New York.

Ho, M., Suwansirikul, S., Dowling, J.N., Youngblood, L.A. und Armstrong, J.A. (1975). The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. New Engl. J. Med. 203: 1109.

Hollander, M. und Wolfe, D. (1972). Nonparametrical Statistical Methods. John Wiley & Sons, New York, p. 68.

Honess, R.W. und Watson, D.H. (1977). Unity and diversity in the herpesviruses. J. Gen. Virol. 37: 15.

Horsmanheimo, M., Jansson, E., Hannuksela, M. und Fudenberg, H.H. (1978). Studies in sarcoidosis: intradermal mycoplasma test. Am. Rev. Respir. Dis. 117: 975.

Horsmanheimo, M. und Virolainen, M. (1974). Correlation of phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation with clinical manifestations of sarcoidosis. Acta Path. Microbiol. Scand. (Sect. B) 82: 122.

Hsu, C. und Lo Gerfo, P. (1972). Correlation between serum alphaglobulin and the plasma inhibitory effects on PHA-stimulated lymphocytes in colon cancer patients. S.E. Biol. Med. 139: 575.

Huang, E.-S., Chen, S.-T. und Pagano, J.S. (1973). Human cytomegalovirus. I. Purification and characterization of viral DNA. J. Virol. 12: 1473.

Humphrey, L.J., Humphrey, M.A., Siugla, O. und Volence, F.J. (1981). Immunologic responsiveness of patients with cancer-relationship to tumor type, stage and prognosis. Ann. Surg. 193: 574.

Hyman, R.W. (1980). Structure and function of the varicella-zoster virus genome. In: Nahmias, A.J., Dowdle, W.R., Schinazi, R.F., eds., The Human Herpesviruses. Elsevier, New York, p. 63.

Isaacs, A. und Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. Proc. Royal Soc. B 147: 258.

Jacobsen, H. und Kirchner, H. (1985). Interferone - biologische Grundlagen und klinische Anwendungen. Klin. Pädiatr. 197: 263.

James, D.G., Neville, E. und Walker, A. (1975). Immunology of sarcoidosis. Am. J. Med. 59: 388.

Junge, V., Hoekstra, J., Wolfe, L. und Deinhardt, F. (1970). Microtechnique for quantitative evaluation of in vitro lymphocyte transformation. Clin. Exp. Immunol. 7: 431.

Kalden, J.R., Burmester, G.R., Manger, B., Coester, C.H. und Bienzle, V. (1983). Immunologische Befunde bei homosexuellen Männern mit generalisierter Lymphadenopathie. Prodromalstadium des "Acquired Immunodeficiency Syndromes"? Klin. Wschr. 61: 1067.

Kataria, Y.P., Sagone, A.L., LoBuglio, A.F. und Bromberg, P.A. (1973). In vitro observations on sarcoid lymphocytes and their correlation with cutaneous energy and clinical severity of disease. Am. Rev. Resp. Dis. 108: 767.

Katz, P. und Fauci, A.S. (1978). Inhibition of polyclonal B-cell activation by suppressor monocytes in patients with sarcoidosis. Clin. Exp. Immunol. 32: 554.

Kilpatrick, B.A., Huang, E.-S. und Pagano, J.S. (1976). Analysis of cytomegalovirus genomes with restriction endonucleases Hind II and Eco R-1. J. Virol. 18: 1095.

Kim, K.S. und Carp, R.J. (1971). Growth of murine cytomegalovirus in various cell lines. J. Virol. 7: 720.

Kirchner, H. (1982). Immunobiology of infection with herpes simplex virus. In: J.L. Melnick, ed., Monographs in Virology Vol. 13, Karger Basel.

Kirchner, H. (1983). Immunobiology of infection with human cytomegalovirus. Adv. Cancer Res. 40: 31.

Kirchner, H. (1984). Interferon gamma. Prog. Clin. Biochem. Med. 1: 169.

Kirchner, H., Brunner, H. und Rühl, H. (1977). Effect of A. laidlawii on murine and human lymphocyte cultures. Clin. Exp. Immunol. 29: 176.

Kirchner, H., Hirt, H.M. und Munk, K. (1977). Protection against herpes simplex virus infection in mice by Corynebacterium parvum. Infect. Immun. 16: 9.

Kirchner, H., Kleinicke, Ch. und Digel, W. (1982). A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. J. Immunol. Methods 48: 213.

Kirchner, H., Schwenteck, M., Northoff, H. und Schöpf, E. (1978). Defective in vitro lymphoproliferative responses to herpes simplex virus in patients with frequently recurrent herpes infections during disease-free interval. Clin. Immunol. Immunopathol. 11: 267.

Klajman, R., Farkas, R., Drucker, J., Schneider, M., Becker, M., Man, B. und Reiss, R. (1980). T-cell-mediated cytotoxicity in patients with colorectal cancer. Clin. Immunol. Immunopathol. 17: 335.

Koenig, A., Koenig, W.D. und Stoeckel, H. (1978). Anästhesie und Immunologie - Eine Übersicht. Prakt. Anästh. 13: 415.

Krech, U. (1973). Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. Bull. WHO 49, 103.

Krech, U., Jung, M. und Jung, F. (1971). Cytomegalovirus infections of man. S. Karger, Basel.

Krishna, R.V., Meurman, O.H., Ziegler, T. und Krech, U.H. (1980). Solid-phase enzyme immunoassay for determination of antibodies to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 12: 46.

Kung, P.C., Goldstein, G., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F. (1979). Monoclonal antibodies defining distinctive human T-cell surface antigens. Science 206: 347.

Lang, D.J. (1972). Cytomegalovirus infections in organ transplantation and post transfusion. A hypothesis. Arch. Virol. 37: 365.

Lang, D.J. und Hanshaw, J.B. (1969). Cytomegalovirus infection and the post-perfusion syndrome. N. Engl. J. Med. 280: 1145.

Lauder, J. und Bone, G. (1973). Lymphocyte transformation in large bowel cancer. Br. J. Cancer 28: 78.

Lee, Y.-T.N. (1977). Effect of anaesthesia and surgery on immunity. J. Surg. Oncol. 9: 425.

Leroux, M., Geisen, H.P., Schindler, L. und Kirchner, H. (1986). Depression of cellular immunity after open-heart surgery. Immunol. Letters 12: 153.

Leroux, M., Schindler, L., Braun, H., Doerr, H.W., Geisen, H.P. und Kirchner, H. (1985). A whole-blood lymphoproliferation assay for measuring cellular immunity against herpes viruses. J. Immunol. Methods 79: 251.

Levin, M.J., Rinaldo, C.R., Leary, P.R., Zaia, J.A. und Hirsch, M.S. (1979). Immune response to herpesvirus antigens in adults with acute cytomegaloviral mononucleosis. J. Infect. Dis. 140: 851.

Libikova, H., Breier, S., Kocisova, M., Pogady, J., Stünzner, D. und Jjhazyova, D. (1979). Assay of interferon and viral antibodies in the cerebrospinal fluid in clinical neurology and psychiatry. Acta Biol. Med. Ger. 38: 879.

Lui, V.K., Karpuchas, P.B., Dent, P.B., McCulloch, P.B. und Blajchman, M.A. (1975). Cellular immunocompetence in melanoma: Effect of extent of disease and immunotherapy. Br. J. Cancer 32: 323.

Macher, A.M., Reichert, C.M., Straus, S.E., Longo, D.L., Parillo, J., Lane, H.C., Fauci, A.S., Rook, A.H., Manischewitz, J.F. und Quinnan, G.V. (1983). Death in the AIDS patient: Role of cytomegalovirus. N. Eng. J. Med. 309: 1454.

MacPerson, J. (1966). Mycoplasmas tissue cultures. J. Cell Sci. 1: 145.

Malis, G.Y. (1948). Research on the etiology of schizophrenia. Cited by Morozov, 1983.

Manger, B.J., Burmester, G.R., Gramatzki, M., Nüßlein, H., Bienzle, V. und Kalden, J.R. (1984). Immunological studies in homosexual men with unexplained lymphadenopathy. Eur. J. Clin. Microbiol. 3: 73.

Mangi, R.J., Dwyer, J.M., Gee, B. und Kantor, F.S. (1974). The effect of plasma upon lymphocyte response in vitro. Clin. Exp. Immunol. 18: 505.

Mangi, R.J., Dwyer, J.M. und Kantor, F.S. (1974). The effect of plasma upon lymphocyte response in vitro. Demonstration of a humoral inhibitor in patients with sarcoidosis. Clin. Exp. Immunol. 18: 519.

Manischewitz, J.E., Young, R.G. und Barile, M.F. (1975). The effect of mycoplasmas on replication and plaquing ability of herpes simplex virus. Publ. Soc. Exp. Biol. Med. 148: 859.

Manousos, O.N., Economou, J., Patholul, J. und Merikas, G. (1973). Disturbance of cell-mediated immunity in patients with carcinoma of colon and rectum. Gut. 14: 739.

Markova, R., Argirova, R. und Boeva, M. (1980). Some parameters of cell-mediated immunity in colon cancer patients. Neoplasma 27: 43.

Matas, A.J., Simmons, A.L. und Najarian, J.S. (1975). Chronic antigenic stimulation, herpes virus infection and cancer in transplant recipients. Lancet 1: 1277.

Mavligit, P., Pollock, R., Reuben, J., Ames, F., Rubio, P. und Jones, J. (1985). Protracted severe immune dysregulation induced by cardiopulmonary bypass: A predisposing etiologic factor in blood transfusion-related AIDS? Abstract, ASCO

Melbye, M., Biggar, R.J., Ebbesen, P., Andersen, H.K. und Vestergaard, B.F. (1983). Lifestyle and antiviral antibody studies among homosexual men in Denmark. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sec. B 91, 357.

Miller, G., Wertheim, P., Wilson, G., Robinson, J., Geelen, J.L., vander Noordaa, J.J. und van der Erb, A.J. (1979). Transfection of human lymphoblastoid cells with herpes simplex virus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 949.

Mindel, A. und Sutherland, S. (1984). Antibodies to cytomegalovirus in homosexual and heterosexual men attending an STD clinic. Br. J. Vener. Dis. 60: 189.

Møller-Larsen, A., Andersen, H.K., Heron, J. und Sarov, J. (1975/1976). In vitro stimulation of human lymphocytes by purified CMV. Intervirology 6: 249.

Mogensen, S.C. (1979). Role of macrophages in natural resistance to virus infections. Microbiol. Rev. 43: 1.

Moises, H.W., Schindler, L., Leroux, M. und Kirchner, H. (1985). Decreased production of interferon alpha and interferon gamma in leucocyte cultures of schizophrenic patients. Acta Psychiatr. Scand. 72, 45.

Morahan, P.S. und Morse, S.S. (1979). Macrophage-virus interactions. In: M. Proffitt, ed. Virus-Lymphocyte Interferons. Implications for Disease. Elsevier/North Holland Biomed. Press, Amsterdam, p. 17.

Morgenroth, K. (1983). Morphologische und ätiologische Aspekte der Sarkoidose. Prax. Klin. Pneumol. 37: 501.

Morozov, P.V. (1983). Research on the viral hypothesis of mental disorders. In: Mendlewicz, J., Van Praag, H.M., eds. Advance in Biological Psychiatry, Vol. 12, S. Karger, Basel VII-IX.

Munk, K. und Donner, F. (1963). Cytopathischer Effekt und Plaquemorphologie verschiedener HSV-Stämme. Arch. ges. Virusforsch. XII, 529.

Nahmias, A.J. und Roizman, B. (1973). Infection with herpes simplex viruses 1 and 2: part 1. New Engl. J. Med. 289: 667.

Nahmias, A.J. und Roizman, B. (1973). Infection with herpes simplex viruses 1 and 2: part 2. New Engl. J. Med. 289:719.

Naraqi, S., Jackson, G.G., Jonasson, O. und Yamashiroya, H.M. (1977). Prospective study of prevalence, incidence, and source of herpesvirus infections in patients with renal allografts. J. Infect. Dis. 136: 754.

Nissen, C., Albrecht, R., Corneo, M., Bruun, D. und Speck, B. (1981). Can whole blood be used instead of separated low density cells for examination of the mitogen response? Blut 43: 41.

Oakes, J.E., Iltis, J.P. und Hyman, R.W. (1977). Analysis by restriction enzyme cleavage of human varicella zoster virus DNAs. Virology 82, 353.

Oreskes, J. und Siltzbach, L.E. (1968). Changes in rheumatoid factor activity during the course of sarcoidosis. Am. J. Med. 44: 60.

Pass, R.F., Long, W.K., Whitley, R.J., Soong, S., Diethlem, A., Reynolds, D.W. und Alford, C.A. (1978). Productive infection with cytomegalovirus and herpes simplex virus in renal transplant recipients: Role of source of kidney. J. Infect. Dis. 137: 556.

Paucker, K., Cantell, K. und Henle, W. (1962). Quantitative studies on viral interference in suspended L-cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. Virology 17: 324.

Pauly, J.L., Sokal, J. E. und Han, T. (1973). Whole-blood culture technique for functional studies of lymphocyte reactivity to mitogens, antigens, and homologous lymphocytes. J. Lab. Clin. Med. 82: 500.

Petri, J., Kaiser, G., Gaal, T., Kovacs, G. und Petri, G. (1981). Cellular immune functions after heart operations. Acta Chir. Acad. Scient. Hung 22: 29.

Pihl, E., Hughes, E., Nind, A. und Nairn, R. (1975). Colonic carcinoma clinico-pathological correlation with immunoreactivity. Br. Med. J. 3: 742.

Pollard, R.B., Rand, K.H., Arvin, A.M. und Merigan, T.C. (1978). Cell-mediated immunity to cytomegalovirus infection in normal subjects and cardiac transplant patients. J. Infect. Dis. 137: 541.

Rapp, F. (1984). Cytomegalovirus and carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst. 72: 783.

Rapp, R. und Reed, C. (1976). Experimental evidence of the oncogenic potential of herpes simplex virus. Cancer Res. 36: 800.

Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G. und Schlossman, S.F. (1979). A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature thymocytes and all peripheral human T cells. J. Immunol. 123: 1312.

Resch, K. (1977). Das Immunsystem. Internist 18: 233.

Riddle, P.R. und Berenbaum, M.C. (1967). Postoperative depression of the lymphocyte response to phytohemagglutinin. Lancet 1: 746.

Rimón, R. (1983). Viral aetiology in schizophrenia? Ann. Clin. Res. 15: 1.

Rimón, R.H., Halonen, P. und Lebon, P. (1983). Antibrain antibodies and interferon in the serum and the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. Adv. Biol. Psychiatry 12: 161.

Rimón, R., Halonen, P., Puhakka, P., Latinen, L., Martila, R. und Slamela, L. (1979I). Immunoglobulin G antibodies to herpes simplex type 1 virus detected by radioimmunoassay in serum and cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. J. Clin. Psychiatry 40: 242.

Rimón, R., Nishmi, M. und Halonen, P. (1979II). Serum and CSF antibody levels to herpes simplex type 1, measles and rubella viruses in patients with schizophrenia. Ann. Clin. Res. 10: 291.

Rinaldo, C.R. Jr., Black, P.H. und Hirsch, M.S. (1977). Virus-leucocyte interactions in cytomegalovirus mononucleosis. J. Infect. Dis. 136: 667.

Roizman, B. (1969). The herpesviruses - a biochemical definition of the group. Current Topics Microb. Immun. 49: 1.

Rosenberg, G.L., Snyderman, R. und Notkins, A.L. (1974). Production of chemotactic factor and lymphotoxin by human leukocytes stimulated with herpes simplex virus. Infect. Immun. 10: 111.

Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., Turner, H.C. und Huebner, R.J. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92: 418.

Roy, R. Beaudoin, R., Roberge, F., Lachance, J.G. und Pelletier, G. (1984). Blood transfusions in renal dialysis patients. Tissue Antigens 23: 203.

Royston, J., Majda, J.A., Baird, S.M., Veserve, B.L. und Griffiths, S.C. (1980). Human T-cell antigens defined by monoclonal antibodies. J. Immunol. 125: 725.

Rüger, R., Burmester, G.R., Kalden, J.R., Bienzle, U., Braun, R., Safai, B., Sterry, W. und Fleckenstein, B. (1984). Search for human cytomegalovirus DNA in Kaposi sarcomas and hemopoietic cells from homosexual men with AIDS or unexplained lymphadenopathy. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology.

Runtianinen, J., Armadottier, T., Molnow, G., Slam, A. und Freue, H. (1981). Myelin basic protein antibodies with serum and CSF of multiple sclerosis and subacute sclerosis parencephalitis patients. Acta Neurol. Scand. 64: 196.

Russel, A.S. (1973). Cell-mediated immunity to herpes simplex virus in man. J. Clin. Pathol. 60: 826.

Rytel, M.W., Aguilar-Torres, F.G., Balay, J. und Hein, L.R. (1978). Assessment of the status of cell-mediated immunity in CMV-infected renal allograft recipients. Cell. Immunol. 37: 31.

Salmi, A., Pamelins, M. und Vainopää, R. (1974). Antibodies against different viral antigens in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. Acta Scand. Psych. 50: 183.

Salom, M. (1978). Effect of anaesthesia and open-heart surgery on lymphocyte responses to phytohemagglutinin and concanavalin A. Acta Anaesth. Scand. 22: 471.

Salo, M. (1980). Effect of anaesthesia and surgery on the number of a mitogen-induced transformation of T and B lymphocytes. Ann. Clin. Res. 10: 1.

Salo, M., Soppi, E., Lassila, O. und Ruuskarien, O. (1981). Suppressor lymphocytes during open heart surgery. J. Clin. Lab. Immunol. 5: 159.

Schirm, J., Roenhorst, H.W. und The, T.H. (1980). Comparison of in vitro lymphocyte proliferations induced by cytomegalovirus-infected human fibroblasts and cell-free cytomegalovirus. Infect. Immun. 30: 621.

Schmitz, H., Doerr, H.W., Kampa, D. und Vogt, A. (1977a). Solid-phase enzyme immunoassay for immunoglobulin M antibodies to cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 5: 629.

Schmitz, H., Kampa, D., Doerr, H.W., Luthardt, T., Hillermanns, H.G. und Würtele, A. (1977b). IgM antibodies to cytomegalovirus during pregnancy. Arch. Virol. 53: 177.

Schooley, R.T., Hirsch, M.S., Covin, R.B., Cosimi, A.B., Tolkoff-Rubin, N.E., McCluskey, R.T., Burton, R.C., Russell, P.S., Herrin, J.T., Delmonico, F.L., Glogi, J.V., Henle, W. und Rubin, R.H. (1983). Association of herpesvirus infections with T-lymphocyte-subset alterations, glomerulopathy, and opportunistic infections after renal transplantation. New Engl. J. Med. 308: 307.

Scheier, M.H., Iscove, N.N., Tees, R., Aarden, L. und von Boehmer, H. (1980). Clones of killer and helper T cells: Growth requirements, specifity and retention of function in long-term culture. Immunol. Rev. 51: 315.

Selroos, O., Nikinmaa, B., Koivunen, E., Riska, H., Tiitinen, H. und Weber, T. (1982). Cellular immunity during follow-up of patients with sarcoidosis of varying duration. Clin. Exp. Immunol. 50: 25.

Semenzato, G., Ciprinai, A., Colombatti, M., Amadori, G., Gasparotto, G. und Serembe, M. (1978). Inhibitors of T cell immune function in sarcoidosis. In: Williams, W.J., Davies, B.H., eds. 8th International Conference on Sarcoidosis and Other Granulomatous Diseases. Alpha Omega Publ. Ltd., Cardiff, p. 466.

Shafir, M., Bekesi, J.G., Papatestas, A., Slater, G. und Aufses, H. (1980). Preoperative and postoperative immunological evaluation of patients with colorectal cancer. Cancer 46: 700.

Shields, J. (1978). Schizophrenia. Towards a new synthesis. In: Wing, J.K., ed. Genetics. Academic Press, London, p. 53.

Smith, M.G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92: 424.

Spector, D.H., Hock, L. und Tamashiro, J.C. (1982). Cleavage maps for human cytomegalovirus DNA strain AD 169 for restriction endonucleases Eco RI, Bgl II, and Hind III. J. Virol. 42: 558.

Starr, S.E., Tolpin, M.D., Friedman, H.M., Paucker, K. und Plotkin, S.A. (1979). Impaired cellular immunity to cytomegalovirus in congenitally infected children and their mothers. J. Infect. Dis. 140: 500.

Stewart, W.E. II (1979). The interferon system. Springer Verlag, Wien. New York.

Stewart, W.E. II, Blalock, J.E., Burke, D.C., Chany, C., Dunnick, J.K., Falcoff, E., Friedman, R.M., Galasos, G.J., Joklik, W.K., Vilcek, J.T., Youngner, J.S. und Zoon, K.C. (1980). Interferon Nomenclature. Nature, London 286: 110.

Stinski, M.F., Thomsen, D.R. und Wathen, M.W. (1981). Structure and function of the cytomegalovirus genome. In: Nahmias, A.J., Dowdle, W.R., Schinazi, R.F., eds. The Human Herpesviruses. An Interdisciplinary Perspective. Elsevier, New York, p. 72.

Taylor-Robinson, D. und Caunt, A.E. (1972). Varicella virus. In: S. Gard, C. Hallauer, K.F. Meyer, eds., Virology Monographs, Vol. 12, Springer Verlag, Wien, New York.

Ten Napel, Chr. H.H., The, T.H., Bijker, J., DeGast, G.C. und Langenhuysen, M.M.A.C. (1977). Cytomegalovirus-directed lymphocyte reactivity in healthy adults tested by a CMV-induced lymphocyte transformation test. Clin. Exp. Immunol. 29: 52.

Tolkoff-Rubin, N., Rubin, R.H., Keller, E.W., Baker, G.P., Stewart, J.A. und Hirsch, M.S. (1978). Cytomegalovirus infection among dialysis patients and personnel. Ann. Intern. Med. 89: 625.

Tolpisky, M., Siltzbach, L.E., Williams, M. und Glade, P.R. (1972). Lymphocyte response in sarcoidosis. Lancet I: 117.

Torrey, E.F. und Peterson, M.R. (1973). Slow and latent viruses in schizophrenia. Lancet 2: 22.

Trinchieri, G., DeMarchi, M., Mayr, W., Savi, M. und Cappellini, R. (1973). ADCC, antibody dependent cell mediated cytotoxicity. Transplant. Proc. 4: 1631.

Vartanian, M.E., Kolyaskina, G.J. und Lozovsky, D.V. (1978). Aspects of humoral and cellular immunity in schizophrenia. In: Bergsma, D., Goldstein, A.L., eds. Neurochemical and Immunologic Components in Schizophrenia. Alan R. Liss, New York, p. 339.

Veien, N.K., Hardt, F. und Bendixen, G. (1978). Humoral and cellular immunity in sarcoidosis. Acta Med. Scand. 203: 321.

von Magnus, P. (1954). Incomplete forms of influenza virus. Adv. Virus Res. 2: 59.

Wahren, B., Carlens, E. und Espmark, A. (1971). Antibodies to various herpes virus in sera from patients with sarcoidosis. J. Natl. Cancer Inst. 47: 747.

Wahren, B., Robert, K.H. und Nordlung, S. (1981). Conditions for cytomegalovirus stimulation of lymphocytes. Scand. J. Immunol. 13: 581.

Waldman, T.A. und Broder, S. (1977). Suppressor cells in the regulation of the immune response. Prog. Clin. Immunol. 3: 155.

Wanebo, H.J., Baskar, R., Attiyeh, F., Pinsky, C., Middleman, P. und Stearns, M. (1980). Immune reactivity in patients with colorectal cancer: Assessment of biologic risk by immunoparameters. Cancer 45: 1254.

Wanebo, H.J. und Pinsky, C.M. (1978). A review of immunologic reactivity in patients with colorectal cancer. In: W. Enker, ed. Carcinoma of the Colon and Rectum. Year Book of Surgery p. 227.

Wanebo, H.J., Pinsky, C.M., Beattie, E.J. und Oettgen, H.F. (1978). Immunocompetence testing in patients with one of the four common operable cancer. A review. Clin. Bull. 8: 15.

Waner, J.L. und Weller, T.H. (1974). Behavior of human cytomegalovirus in cell cultures of bovine and simian origin (37814). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 379.

Waner, N.L., Szenberg, A. und Burnet, F.M. (1962). The immunological role of different lymphoid organs in chicken. I. Disension of immunological responsiveness. J. Exp. Biol. Med. Sci. 40: 373.

Wasserman, N., Ito, M., Barron, A.L., Reisman, R.E. und Arbesman, C.E. (1975). Herpes simplex virus in patients with sarcoidosis. Lymphocyte transformation in vitro and antibody response. New York State J. Med. 1975: 850.

Wekerle, H., Eshor, Z., Lonai, P. und Feldman, M. (1975). Thymus-derived rat lymphocyte receptor for cell surface antigens is a non serologically defined product of the major histocompatibility gene complex. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 1147.

Weller, T.H., Macanley, J.C. Craig, J.M. und Wirth, P. (1957). Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94: 4.

Yoshida, T., Siltzbach, L.E., Masih, N. und Cohen, S. (1979) Serum migration inhibitory activity in patients with sarcoidosis. Clin. Immunol. Immunopathol. 13: 39.

Zembala, M., Mytar, B., Popiela, T. und Asherson, G.L. (1977). Depressed in vitro peripheral blood lymphocyte response to mitogens in cancer patients: The role of suppressor cells. Int. J. Cancer 19: 605.

Lebenslauf

Monique Odette Leroux

1955	am 15. Mai geboren in Biberach/Riß
1962 - 1966	Besuch der Grundschule in Biberach/Riß
1966 - 1974	Besuch des Pestalozzi-Gymnasiums in Biberach/Riß
1974	Ablegung der Reifeprüfung
1975	Studium Germanistik/Romanistik an der Universität Tübingen
1975	ab Wintersemester 1975/76 Studium der Pharmazie an der Universität Tübingen
1979	Ablegung des 1. Staatsexamens
1980	Ablegung des 2. Staatsexamens
1981	Ablegung des 3. Staatsexamens
1981	Erlaubnis zur Ausübung des Apothekerberufs
1981 - 1986	Anfertigung der Dissertation "Entwicklung einer Vollblut-Technik zur Messung der zellulären Immunität gegen Herpesviren" unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Reinhard, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen und Herrn Prof. Dr. med. H. Kirchner, Institut für Virusforschung, Abteilung Tumorvirusimmunologie, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
1982	Approbation als Apotheker

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren

H. Auterhoff, H.P.T. Ammon, E. Graf, H. Kirchner, K.-A. Kovar, E. Reinhard, J.E. Schultz